



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

**Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση
Περιβάλλοντος»**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«Μελέτη επί της αντιμετώπισης της ανθράκωσης της
καρυδιάς και του φαινοτύπου
απομονώσεων του παθογόνου αιτίου *Ophiognomonia
leptostyla* (Fr.) Sogonov»**



Μαρία Καρακούση

ΒΟΛΟΣ 2019

«Μελέτη επί της αντιμετώπισης της ανθράκωσης της καρδιάς και του φαινοτύπου απομονώσεων του παθογόνου αιτίου *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonon»

Μαρία Καρακούση

Ευάγγελος Βέλλιος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αναπληρωτής Καθηγητής, Φυτοπαθολογία-Σύγχρονες Μέθοδοι Διαγνωστικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Τσιρόπουλος (Μέλος)

Καθηγητής, Χημεία, Ανάλυση και Προσδιορισμός Οργανικών Ουσιών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γεώργιος Νάνος (Μέλος)

Καθηγητής, Δενδροκομία Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στην οικογένειά μου και σε όλους
όσους στάθηκαν στο πλευρό μου...

Copyright © ΜΑΡΙΑ ΚΑΡΑΚΟΥΣΗ 2019

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος, All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, υπό την επίβλεψη του Ευάγγελου Βέλλιου, Αναπληρωτή Καθηγητή Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και την αμέριστη συμπαράσταση και τη πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια του πειράματος. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Φένια Λολιοπούλου για την βοήθεια που μου προσέφερε και τις πολύτιμες συμβολές της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ε. Παναγιωτάκη για τις χρήσιμες συμβουλές της και την υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Χημείας, Ανάλυσης και Προσδιορισμού Οργανικών Ουσιών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Νικόλαο Τσιρόπουλο και τον Καθηγητή Δενδροκομίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Γεώργιο Νάνο, για τη συμμετοχή τους στη τριμελή επιτροπή της διατριβής μου.

Εκτός από τους ανωτέρω θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Εφαρμοσμένης Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Νικόλαο Παπαδόπουλο για την παραχώρηση του χώρου και των μέσων του Εργαστηρίου Εντομολογίας για την ολοκλήρωση των πειραμάτων μου. Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στις φίλες μου Ελένη Ανθούλη και Raínda Barua για την πολύτιμη βοήθεια τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη τους, την αγάπη τους και την τεράστια υποστήριξή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, τους γονείς μου καθώς και την αδερφή μου διότι πάντα είναι στο πλευρό μου. Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον Αλέξανδρο που πάντα βρίσκεται στο πλευρό μου και υποστηρίζει τις επιλογές μου.

Περίληψη

Η ανθράκωση αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη απειλή για τη καλλιέργεια της καρυδιάς που οφείλεται στο μύκητα *Gnomonia leptostyla*. Στη παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν πέντε δραστικές ουσίες από διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων για την αντιμετώπιση της ασθένειας οι οποίες δεν εφαρμόζονται στη καλλιέργεια στη χώρα μας. Αρχικά, έγινε συλλογή των δειγμάτων από προσβεβλημένα φύλλα το καλοκαίρι του 2016 από δύο περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας, το Παλαμά Δομοκού στο Νομό Φθιώτιδας και τη Μπούφα στο Νομό Μαγνησίας και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι απομονώσεις του μύκητα σε τεχνικό θρεπτικό υπόστρωμα οι οποίες αναπτύχθηκαν στους 20°C σε επωαστικό θάλαμο. Οι δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν στις απομονώσεις ήταν οι εξής: cyproconazole, boscalid, fenhexamid, pyrimethanil και azoxystrobin σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,001 mg/L, 0,01mg/L, 0,1mg/L, 1mg/L, 10mg/L). Επίσης πραγματοποιήθηκε πείραμα ελέγχου ανθεκτικότητας στα παραπάνω μυκητοκτόνα σε πλάκες μικροτιτλοδότησης όπως περιγράφεται από τη FRAC για άλλους μικροοργανισμούς. Στη συγκεκριμένη μελέτη οι απομονώσεις του μύκητα πραγματοποιήθηκαν με 3 διαφορετικές μεθόδους από τις οποίες οι δύο είναι νέες και εφαρμόστηκαν επιτυχώς για πρώτη φορά στο συγκεκριμένο πείραμα. Στις απομονώσεις μελετήθηκε επίσης ο φαινότυπος του παθογόνου και έγινε παρουσίασή του μέσω φωτογραφικού υλικού σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής του. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως δεν εμφανίστηκε ανθεκτικότητα του μύκητα σε καμία από τις δραστικές ουσίες και πως η πιο αποτελεσματική από τις δραστικές ουσίες ήταν το azoxystrobin μιας και σε όλες τις δόσεις και σχεδόν σε όλες τις απομονώσεις εμπόδισε την περαιτέρω ανάπτυξη του μυκηλίου. Θα μπορούσε να προταθεί ως δραστική ουσία το azoxystrobin για την καταπολέμηση της ασθένειας και επιπλέον έρευνα για την έγκρισή του από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Επιπλέον, όσον αφορά το φαινότυπο, ο μύκητας παρουσίασε 4 διαφορετικούς τύπους φαινοτύπου στους οποίους ταξινομήθηκαν όλες οι απομονώσεις ανάλογα με τη μορφολογία τους. Η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία ήταν σταθερή κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του μύκητα σε όλες τις απομονώσεις, παράγοντες που δεν επηρέασαν το φαινότυπο των απομονώσεων. Τέλος, οι διαφοροποιήσεις του φαινοτύπου πιθανόν να

οφείλονται σε γενετικούς παράγοντες οι οποίοι δε μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία και απαραίτητη είναι η περαιτέρω μελέτη επί του θέματος.

Abstract

Anthracoze is probably the most devastating threat to the cultivation of walnut due to the fungus *Gnomonia leptostyla*. In the present study, five active substances from different groups of fungicides which are not registered for the walnut disease management in our country were applied. Firstly, samples of infected leaves were collected from two areas of Central Greece, Palamas Domokos in the prefecture of Fthiotida and Boufa in the Prefecture of Magnesia during the summer 2016, and then fungus was isolated by the leaves and cultured in technical nutrient substrate and developed at 20 °C incubation chamber. The active substances studied were: cyproconazole, boscalid, fenhexamid, pyrimethanil and azoxystrobin in five different concentrations (0,001 mg/L, 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L). Furthermore, fungicide resistance was accomplished on Microtiter plates as described by FRAC for other microorganisms. In this study, fungal isolates were carried out using 3 different methods, two of which were new and successfully applied for the first time. The phenotype of the pathogen was also studied in isolates and was presented through photographs at different stages of its growth. The experiments' results showed that none of the isolates is resistant to any of the active substances and the most effective substance was azoxystrobin. Azoxystrobin may be proposed as an active substance to combat the disease and for additional research. In addition, concerning to the phenotype, the fungus presented 4 different types of phenotype in which all the isolates were classified according to their morphology. Temperature and relative moisture were stable during the experiment and didn't affect the phenotype of the isolates. Finally, variations in phenotype may have occurred due to genetic factors not studied in this research and further study on the subject is necessary.

Εγώ η Καρακούση Μαρία, είμαι συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρους της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή του εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Καρακούση Μαρία

Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την Καρακούση Μαρία.

Βέλλιος Ευάγγελος

Περιεχόμενα

Πρόλογος-Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.2. Παθογόνο αίτιο	16
1.3. Ετεροθαλλισμός	22
1.4. Αντιμετώπιση της ασθένειας	23
1.5. Μελέτη ανθεκτικότητας του μύκητα <i>in vitro</i>	25
1.6. Σκοπός διατριβής	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1. Συλλογή δειγμάτων	31
2.2. Εξαγωγή DNA από απομονώσεις του μύκητα <i>Marssonina juglandis</i>	35
2.3. Πείραμα ελέγχου ανθεκτικότητας και αποτελεσματικότητας των δραστικών ουσιών <i>in vitro</i>	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
3.1. Συλλογή των δειγμάτων	44
3.2. Ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα <i>Ophiognomonina leptostyla</i> σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα	46
3.3. Αποτελεσματικότητα των μεθόδων απομόνωσης του μύκητα	47
3.4. Φαινότυπος μυκηλιακής ανάπτυξης	48
3.5. Έλεγχος της ανθεκτικότητας των μυκητοκτόνων	69
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Πλάνο της πλάκας μικροτιτλοδότησης για τη δοκιμή *in vitro* της αποτελεσματικότητας δραστικών ουσιών όπως εφαρμόστηκε

Πίνακας 2: Κωδικοί όλων των απομονώσεων και οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκαν

Πίνακας 3: Κατηγοριοποίηση των απομονώσεων ανά φαινότυπο

Πίνακας 4: Τιμές EC50 για κάθε απομόνωση συγκριτικά με την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα *Gnomonia leptostyla* σε απορρόφηση 450nm

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Φύλλα προσβεβλημένα από το μύκητα

Εικόνα 2: Σχηματισμένα ακέρβουλα πάνω σε προσβεβλημένο φύλλο καρυδιάς

Εικόνα 3: Δικότταρα κονίδια του μύκητα *Marssonina juglandis* (Adobe Photoshop 200x)

Εικόνα 4: Μέτρηση των διαστάσεων των κονιδίων του μύκητα (Adobe Photoshop 200x)

Εικόνα 5: Μονοκύτταρα κονίδια πριν καθιστούν δικότταρα (Nikon Labophot-2 (200x))

Εικόνα 6: Σχηματισμοί ακέρβουλων πάνω σε μυκηλιακές υφές. Στερεοσκοπική παρατήρηση (Nikon SMZ-4)

Εικόνα 7: Σχηματισμός οστίολης πάνω σε περιθήκιο της απομόνωσης 12. Στερεοσκοπική παρατήρηση (Nikon SMZ-4)

Εικόνες 8-55: Φαινοτυπική παρουσίαση

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Αποτελεσματικότητα επί της % συγκριτικά των τριών μεθόδων απομόνωσης

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ανθράκωση της καρυδιάς

Η ανθράκωση αποτελεί μία από τις σημαντικότερες ασθένειες που απειλούν τη καλλιέργεια της καρυδιάς (*Juglans regia* L.) και πιο συγκεκριμένα είναι η πιο καταστροφική μυκητολογική ασθένειά της. Η ανθράκωση περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Gard το 1928 και στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλοι ερευνητές (Hammond 1931, Miller *et al.* 1945) οι οποίοι ασχολήθηκαν με την ασθένεια. Στη χώρα μας για πρώτη φορά έγινε αναφορά από τον Apostolides το 1952. Η καλλιέργεια της καρυδιάς ολοένα και αυξάνεται στην Ελλάδα και η αντιμετώπιση της ανθράκωσης κρίνεται συνεχώς όλο και πιο απαραίτητη. Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα και η καταπολέμησή της ασθένειας που προκαλεί, προσέλκυσε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών (Berry 1977, Black and Neely 1978, Neely 1976, Neely 1981, Vechelyi, Penzes-Toth 1990, Rouskas *et al.* 1994) οι οποίοι πραγματοποίησαν μελέτες που αφορούσαν στην ασθένεια.

Η ανθράκωση είναι η πιο κοινή ασθένεια που προσβάλλει όλα τα είδη *Juglans*, στο οποίο ανήκει και η καρυδιά (*Juglans regia*). Προσβάλλονται κυρίως τα φύλλα σε νεαρά δένδρα αλλά και σε φυτά μεγαλύτερης ηλικίας. Πολλοί καρυδεώνες στο Βορειοδυτικό Ιράν προσβλήθηκαν από την ανθράκωση όπου προηγουμένως είχε παρατηρηθεί μεγάλη εξάπλωση της ασθένειας σε διάφορες περιοχές του Ιράν όπου καλλιεργούνταν καρυδιές. Η ασθένεια οδήγησε σε έως και 60% μείωση της ετήσιας απόδοσης (Saremi and Amiri 2010). Επίσης αναφορές για επιδημική προσβολή έγιναν στις ανατολικές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών, στη Νότια Αμερική, στην Ευρώπη και στην Ασία (Belisario 2008, Berry 1981, Juhasova *et al.* 2006, Neely and Black 1976).

1.2. Παθογόνο αίτιο

Το παθογόνο αίτιο που προκαλεί την ανθράκωση είναι ο Ασκομύκητας *Ophiognomonium leptostyla* (syn. *Gnomonia leptostyla*) (Fr) Ces et de Not (οικογένεια Gnomoniaceae). Η ατελής μορφή του μύκητα είναι γνωστή ως *Marssonina juglandis* (syn. *Marssoniella juglandis*) (I, Lib.) Magn.

Τα ασκοσπόρια είναι αυτά που προκαλούν το πρωτογενές μόλυσμα στα φύλλα των δένδρων ενώ οι δευτερογενείς προσβολές στη νέα βλάστηση γίνονται από τα ήδη σχηματιζόμενα κονίδια του μύκητα σε όλη τη βλαστική περίοδο (Rosnev, Tsanov, 1980).

1.2.1. Συστηματική κατάταξη του μύκητα

Ο μύκητας που προκαλεί την ανθράκωση στη καρυδιά ανήκει στο βασίλειο των μυκήτων, του φύλου ή συνομοταξίας των Ασκομυκήτων (Ascomycota) της ομοταξίας των Sordariomycetes, της τάξης των Diaporthales, της οικογένειας των Gnomoniaceae, γένους *Gnomonia* (*Ophiognomonia*), του είδους *G. leptostyla* με ατελή μορφή το είδος *Marssonina juglandis* (Sogonov, Castlebury, Rossman, Mejia, White 2008).

1.2.2. Στάδια προσβολής του φυτού

Σε διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, παρατηρήθηκε προσβολή από το παθογόνο στο φύλλωμα αλλά και σε καρπούς που είχε σαν αποτέλεσμα τη ποσοτική μείωση της παραγωγής καθώς και τη πρόωρη φυλλόπτωση. Οι Black και Neely (1978) από μελέτες που πραγματοποίησαν, αναφέρουν ότι δεν έχει εξακριβωθεί σε ποια ακριβώς στάδια γίνεται η προσβολή αλλά είναι σημαντικές οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία καθώς και η μεταξύ τους συσχέτιση. Παρατηρήθηκε ότι το υψηλό ποσοστό σχετικής υγρασίας επιταχύνει τη μόλυνση αν παραμείνει βρεγμένη η φυλλική επιφάνεια για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η θερμοκρασία επιδρά δραματικά στην ανάπτυξη της ασθένειας. Θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15 έως 21°C προκάλεσαν υψηλά επίπεδα μόλυνσης με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 21°C. Σύμφωνα με τον Fayret (1967) το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών για τη παραγωγή των κονιδίων και την ανάπτυξη του παθογόνου είναι 20-21°C. Χαμηλότερες θερμοκρασίες είχαν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της εμφάνισης των συμπτωμάτων ενώ θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 21°C ανέστειλαν σε

σημαντικό βαθμό τη μόλυνση. Γενικά, οι κλιματολογικές συνθήκες με υψηλή σχετική υγρασία και μέτριες θερμοκρασίες ενισχύουν την πιθανότητα μόλυνσης από τον μύκητα *Gnomonia leptostyla* (Black and Neely 1978).

1.2.3. Συμπτώματα και σημεία της προσβολής

Τα συμπτώματα παρουσιάζονται σε όλα τα πράσινα μέρη του φυτού, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των βλαστών, των μίσχων και των καρπών (Berry 1970, Belisario 1992, Belisario 1996). Όλα τα μέρη του φύλλου μπορούν να μολυνθούν. Κατά τη περίοδο της βλάστησης εμφανίζονται καστανές έως μαύρες πολυγωνικές κηλίδες, λιγότερο ή περισσότερο στρογγυλεμένες με ακανόνιστες απολήξεις, κάποιες φορές παρουσιάζοντας χλώρωση στην περιφέρειά τους και κάποιες άλλες φορές όχι. Πολύ συχνή είναι η παρατήρηση γκρι χρωματισμού ή αποχρωματισμού στο κέντρο των κηλίδων. Οι κηλίδες αρχικά έχουν διάμετρο 2-5mm, αλλά στη συνέχεια συγχωνεύονται, σχηματίζοντας μεγάλες νεκρωτικές περιοχές, κυρίως στις άκρες ή στις απολήξεις των φύλλων (Belisario 2002). Μικρότερες νεκρωτικές κηλίδες εμφανίζονται στην επιφάνεια των καρπών (Cline and Neely 1984). Οι κηλιδώσεις στα φύλλα, στους βλαστούς και στους μίσχους είναι επιμήκεις και ελαφρά βυθισμένες και με την πάροδο του χρόνου αυξάνονται σε μέγεθος και βυθίζονται προς το εσωτερικό. Μερικές φορές, σε βλαστούς δένδρων οι οποίοι βρίσκονται υπό σκιά, οι κηλίδες είναι πιο επιμήκεις (Belisario 1992).

Οι πρωτογενείς μολύνσεις εμφανίζονται στα νεαρά φύλλα με πλήρως ανεπτυγμένο έλασμα και δημιουργούν πολλές εστίες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στη δευτερογενή μόλυνση. Η σποριοποίηση πραγματοποιείται κυρίως στην κάτω επιφάνεια των φύλλων και λιγότερο στην πάνω επιφάνεια. Ακέρβουλα φαιού ή μαύρου χρωματισμού με διάμετρο 0,2mm, δημιουργούνται σε ομόκεντρους δακτυλίους στις περιοχές των σχηματισμένων κηλίδων (Belisario *et al.* 2001). Τα φύλλα που έχουν υποστεί έντονη προσβολή πέφτουν πρόωρα. Οι νεκρωτικές κηλίδες που έχουν σχηματιστεί σε φύλλα, βλαστούς και μίσχους μπορεί να προκαλέσουν μέχρι και απώλεια της βλάστησης. Οι πρώιμες μολύνσεις στους καρπούς μπορεί να

προκαλέσουν παραμόρφωσή τους αλλά και πολύ έντονο μαύρισμα και τελικά μείωση στη ποιότητα (Berry 1970). Αποτέλεσμα των πολύ έντονων προσβολών είναι η πρόωρη πτώση των φύλλων και των καρπών, η μη επαρκής ξυλοποίηση του κελύφους των καρυδιών, η εξασθένηση του δένδρου και σε πιο σπάνιες περιπτώσεις η νέκρωση του δένδρου.

1.2.4. Βιολογικός κύκλος του παθογόνου

Το παθογόνο διαχειμάζει κυρίως με τη μορφή αναπτυσσόμενων περιθήκιων στα φύλλα που βρίσκονται πεσμένα στο έδαφος. Σε κάποιες περιοχές διαχειμάζει ως μυκηλιακή αποικία ή ως ακέρβουλο στις ήδη σχηματισμένες κηλίδες. Τα περιθήκια ωριμάζουν κατά την περίοδο της άνοιξης και παράγουν ασκοσπόρια όταν ο καιρός παραμένει βροχερός για αρκετές εβδομάδες. Τα ασκοσπόρια που μεταφέρονται με τον άνεμο είναι αυτά που κυρίως προκαλούν πρωτογενείς μολύνσεις. Όμως πρωτογενείς μολύνσεις μπορεί να προκαλέσουν και τα κονίδια που διασπείρονται μέσω του νερού (Vechelyi and Penzes-Toth 1990).

Βασική προϋπόθεση για τη βλάστηση και την πρόκληση μόλυνσης των σπορίων είναι η επιφάνειες του φυτού ξενιστή να είναι υγρές. Μετά τη βλάστηση το παθογόνο παράγει ασκοσπόρια τα οποία διεισδύουν σε υγιή τμήματα των φύλλων ή των καρπών και τα προσβάλλουν. Οι κηλίδες οι οποίες δημιουργούνται αυξάνονται κατά πολύ σε μέγεθος και γίνονται ορατές περίπου 15 ημέρες αργότερα σε περιόδους όπου τα φύλλα παρέμειναν βρεγμένα για περισσότερες από 12 ώρες, ενώ τα ακέρβουλα αναπτύσσονται συνήθως 3 μέρες μετά τη δημιουργία των κηλίδων. Στη συνέχεια, προκαλούνται νέες προσβολές (δευτερογενείς) στη νέα βλάστηση από τα σχηματιζόμενα κονίδια, καθ' όλη τη διάρκεια της βλάστησης (Vechelyi and Penzes-Toth 1990). Πιο συγκεκριμένα, τον Μάιο παρατηρούνται νέες μολύνσεις από τα ασκοσπόρια κυρίως στο φύλλωμα και δευτερευόντως στους βλαστούς και τους νεαρούς καρπούς. Ευνοϊκές συνθήκες για τις πρωτογενείς μολύνσεις είναι η υψηλή σχετική υγρασία και θερμοκρασίες $>15^{\circ}\text{C}$ (βέλτιστη 21°C) (Ρούσκας Δ.) Οι δευτερογενείς μολύνσεις προκαλούνται από τα σχηματιζόμενα κονίδια.

1.2.5. Συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου

Ελάχιστες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την αιτία που προκαλεί την ανθράκωση στη καρυδιά. Αναφέρεται ότι τα περιθήκια σχηματίζονται μόνο στα μολυσμένα φύλλα που παραμένουν στο έδαφος κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Klebahn 1907). Από τα περιθήκια απελευθερώνονται δίκύτταρα ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια προκαλούν την άνοιξη τις προσβολές στα φύλλα. Σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη διασπορά των ασκοσπορίων και των κονιδίων αποτελεί η βροχόπτωση (Berry 1961). Επισημάνθηκε επίσης ότι σχετική υγρασία $\geq 70\%$ αυξάνει τη πιθανότητα μόλυνσης (Gard 1928). Από διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί προκύπτει ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και γενικότερα οι κλιματολογικές συνθήκες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τόσο την ανάπτυξη του παθογόνου όσο και την εξέλιξη της ασθένειας.

Ο σχηματισμός των περιθήκιων ευνοείται μεταξύ θερμοκρασιών 7-10°C και η παραγωγή των ασκοσπορίων ευνοείται στους 10°C. Η εμφάνιση των ασκοσπορίων ξεκινά μία ώρα μετά από την έναρξη της βροχόπτωσης και 5-6 ώρες αργότερα φτάνει στη μέγιστη παραγωγή ασκοσπορίων. Τα κονίδια διασπείρονται μόνο όταν η βροχόπτωση είναι επαρκής και το νερό αρκετό έτσι ώστε να κυλά πάνω στις επιφάνειες του φυτού. Οι θερμοκρασίες μεταξύ 18-26°C είναι οι πιο ευνοϊκές για τη παραγωγή των ακέρβουλων και των κονιδίων. Τα κονίδια όπως και τα ασκοσπόρια βλαστάνουν πιο γρήγορα σε θερμοκρασίες μεταξύ 24-26°C (Wayne and Howard 2005).

Κατά τη μελέτη του μύκητα *Ophiognomonium leptostyla* έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξή του *in vitro*. Τα θρεπτικά μέσα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες είναι τα εξής: PDA (Potato-Dextrose Agar, πατάτα-δεξτρόζη-άγαρ), CMA (Corn-meal Agar, άγαρ αραβοσίτου) και NA (Nutrient Agar, θρεπτικό άγαρ) ως πολύ θρεπτικά μέσα (Saremi and Amiri 2010). Η καταλληλότητα των θρεπτικών μέσων κρίθηκε με συγκεκριμένα κριτήρια, όπως η ανάπτυξη του μυκηλίου, η παρουσία ακέρβουλων ή περιθήκιων καθώς και η παρουσία σπορίων (κονίδια). Η καταλληλότερη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσεται ο μύκητας είναι 21°C (Saremi and Amiri 2010). Τα σπόρια του μύκητα παρατηρούνται

συνήθως 40 ημέρες μετά από την απομόνωση. Το μυκήλιο αναπτύσσεται περιφερειακά και κυκλικά σχηματίζοντας συνήθως ομόκεντρους κύκλους ή αποκτώντας γενικότερα κυκλικούς σχηματισμούς. Το χρώμα του μυκηλίου είναι λευκό και στη συνέχεια αποκτά πιο σκούρους χρωματισμούς και γίνεται υπόλευκο ή ελαφρώς πιο κίτρινο. Το φως και η υγρασία επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του μύκητα. Ένας άλλος παράγοντας όμως που επιδρά στην ανάπτυξη είναι το pH του υποστρώματος.

1.2.6. Περιγραφή του μυκηλίου

Ο μύκητας κατά την ανάπτυξη του μυκηλίου παρουσιάζει αρκετές μορφολογικές διαφορές. Αυτές οι διαφοροποιήσεις παρουσιάζονται πιο έντονα κατά την ανάπτυξη της μυκηλιακής αποικίας όπου εμφανίζονται. Η ανάπτυξη της μυκηλιακής αποικίας είναι κατά βάση μονόχρωμη και δε φέρει πολλούς διαφορετικούς χρωματισμούς. Είναι συνήθως λευκού, υπόλευκου χρωματισμού και σε κάποια σημεία παρατηρείται πιο σκούρος χρωματισμός. Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται ο σχηματισμός σφαιρικών σχηματισμών που μοιάζουν με φούσκες στα σημεία ανάπτυξης των μυκηλιακών υφών. Οι μυκηλιακές υφές αναπτύσσονται κυρίως περιφερειακά των σημείων εκδήλωσής τους, κάτω από την επιφάνεια, συνήθως είναι βαμβακώδεις επιφανειακά σχηματίζοντας κυκλικούς σχηματισμούς και διαφέρουν αναλόγως με τις συνθήκες ανάπτυξης (Hyun and Hyeon 2000).

1.2.7. Περιγραφή της τέλειας μορφής

Ο μύκητας *Gnomonia leptostyla* αναπαράγεται όπως και οι περισσότεροι μύκητες με δύο τρόπους: εγγενώς και αγενώς. Ο συγκεκριμένος μύκητας όπως και πολλοί άλλοι μύκητες, κατά την εγγενή αναπαραγωγή (τέλεια μορφή) αναπτύσσει καρποφορίες σχηματίζοντας φιαλοειδή περιθήκια εντός των προσβεβλημένων οργάνων του φυτού και διαθέτουν οστιόλη. Τα περιθήκια μήκους αυτά διαθέτουν ροπαλοειδείς ασκούς που περιέχουν ανισομεγέθη δικύτταρα ασκοσπόρια σχήματος ατρακτοειδούς, διαστάσεων 17-26μm x 2-6μm (Τζάμος 2007, Saremi, Amiri 2010).

1.2.8. Περιγραφή της ατελούς μορφής

Κατά την αγενή αναπαραγωγή (ατελής μορφή) σχηματίζονται καρποφορίες, γνωστές ως ακέρβουλα σκούρου χρωματισμού (φαιού έως τεφρού). Συνήθως είναι αβαθή και σχηματίζονται κάτω από την εφυμενίδα των προσβεβλημένων φύλλων. Τα ακέρβουλα σχηματίζουν κονιδιοφόρους οι οποίοι φέρουν κονίδια. Τα κονίδια είναι άχρωμα, υαλώδη, τοξοειδή και οξυκατάληκτα μήκους 19-28μm x 2-5μm. Τα κονίδια στην αρχή είναι μονοκύτταρα αλλά στη συνέχεια καθίστανται δικύτταρα (Τζάμος 2007, Saremi, Amiri 2010).

1.3. Ετεροθαλλισμός

Οι περισσότεροι ασκομύκητες είναι ομόθαλλοι. Υπάρχουν όμως και ετεροθαλλικά είδη. Ο Fayret (1974) ανέφερε το φαινόμενο της παρεμπόδισης του φωτός στο σχηματισμό περιθήκιων. Ανέφερε επίσης ότι τα περιθήκια δεν αναπτύσσονται πλήρως στους 20°C και για την πλήρη ανάπτυξή τους απαιτείται χαμηλή θερμοκρασία για μεγάλη χρονική περίοδο. Ο μύκητας *Gnomonia leptostyla* αναφέρθηκε ως διπολικός ετερόθαλλος μύκητας (Fayret 1970). Ο ετεροθαλλισμός στο είδος αυτό αναφέρθηκε από τους Metteoni και Neely (1979). Ο Belisario (2002) ανέφερε το μύκητα και ως ομοθαλλικό αλλά και ως ετεροθαλλικό είδος. Οι Belisario *et al.*, (2008), σε απομονώσεις που συλλέχθηκαν από διαφορετικές κλιματικά περιοχές στην Ιταλία, ανέφεραν ομοθαλλισμό. Σε μία άλλη μελέτη, μετά από 4 μήνες επώασης, σε απομονώσεις από διάφορες περιοχές του Ιράν παρατηρήθηκαν πλήρως ανεπτυγμένα περιθήκια (Salahi 2006).

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε απομονώσεις από διάφορες περιοχές του Ιράν, παρατηρήθηκε ότι μόνο στο 10,7% των απομονώσεων παράχθηκαν γόνιμα περιθήκια και μπορούν να χαρακτηριστούν ως ομοθαλλισμός. Οι περισσότεροι ασκομύκητες χαρακτηρίζονται ως ομόθαλλοι αλλά κάποια είδη παρουσιάζουν ετεροθαλλισμό. Τα ομοθαλλικά είδη έχουν ένα μεγάλο πλεονέκτημα έναντι των ετεροθαλλικών, επειδή είναι σεξουαλικά αυτογόνημα (Wheeler 1954). Απομονώσεις οι οποίες δεν παράγουν γόνιμα περιθήκια είναι πιθανότατα ετερόθαλλοι. Για να αποδειχθεί ο ετεροθαλλισμός

κάποιων ειδών απαιτείται περαιτέρω μελέτη (Soleimani, Rasoul, Hamid-Reza and Saeed 2010).

1.4. Αντιμετώπιση της ασθένειας

Η εκδήλωση της ασθένειας μπορεί να αποτραπεί κυρίως με προληπτικά μέτρα πριν εμφανιστούν τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας. Πρώτα απ' όλα θα πρέπει να πραγματοποιείται συλλογή των πεσμένων φύλλων από το φθινόπωρο και καταστροφή τους καθώς με αυτό τον τρόπο μειώνεται η ποσότητα του μολύσματος που απελευθερώνεται κατά τη περίοδο της άνοιξης και έτσι αποτρέπεται ή μειώνεται σε σημαντικό βαθμό η προσβολή. Συνίσταται η απομάκρυνση και το κάψιμο των πεσμένων στο έδαφος ξερών φύλλων και ενσωμάτωσή τους με ελαφρύ φρεζάρισμα. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η λίπανση. Καλό είναι να αποφεύγονται τα μικτά λιπάσματα και να προτιμώνται τα αζωτούχα όπως θειική και νιτρική αμμωνία. Το σωστό κλάδεμα κατέχει πρωταρχικό ρόλο στη πρόληψη της ασθένειας καθώς εξασφαλίζεται ο κατάλληλος αερισμός των δένδρων και με αυτό το τρόπο μειώνεται η υγρασία στο εσωτερικό της κόμης του δένδρου. Τέλος, με τη χρήση εγκεκριμένων μυκητοκτόνων από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων που πραγματοποιούνται με ψεκασμούς όπως αναφέρονται από το Υπουργείο η καταπολέμηση του παθογόνου είναι σαφώς αποτελεσματικότερη (Γεωργόπουλος Σ., Ζιώγας Β., 1992, Ρούσκας Δ.).

Η καταπολέμηση μπορεί να είναι αποτελεσματική εάν πραγματοποιηθεί στα συνιστώμενα βλαστικά στάδια με χαλκούχα ή άλλα μυκητοκτόνα. Απαιτούνται ψεκασμοί το φθινόπωρο στα πεσμένα φύλλα και κατά την περίοδο της έναρξης της βλάστησης. Οι ψεκασμοί συνιστανται έως το τέλος Μαΐου. Στους νέους οπωρώνες γίνεται χρήση χαλκούχων σκευασμάτων για τη προστασία από τη βακτηρίωση, τα οποία είναι αποτελεσματικά και για την ανθράκωση. Η πιο κρίσιμη περίοδος για τη πραγματοποίηση πρωτογενών μολύνσεων από τα ασκοσπόρια είναι κατά τον Απρίλιο και το Μάιο (Ρούσκας Δ.).

Όσον αφορά τη χημική καταπολέμηση της ανθράκωσης στην καλλιέργεια της καρυδιάς δεν υπάρχουν πάρα πολλές πληροφορίες στην

παγκόσμια βιβλιογραφία. Στη χώρα μας, το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων είναι υπεύθυνο για την έγκριση καθώς και για τη πληροφόρηση της εφαρμογής του εκάστοτε σκευάσματος ανά καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, για την καταπολέμηση της ανθράκωσης στη καρυδιά οι δραστικές ουσίες που είναι εγκεκριμένες από το Υπουργείο είναι οι εξής: χαλκούχα σκευάσματα όπως bordeaux mixture (βορδιγάλιος πολτός), copper hydroxide, copper oxychloride, Tribasic copper sulfate αλλά και οι δραστικές ουσίες boscalid, dodine, myclobutanil και pyraclostrobin (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2018). Η χημική αντιμετώπιση της ασθένειας στηρίζεται κατά βάση σε σκευάσματα χαλκού.

Τα χαλκούχα σκευάσματα, όπως ο βορδιγάλιος πολτός, ο οποίος είναι και ο πιο αποτελεσματικός, γενικά θεωρούνται αποτελεσματικά κατά πολλών μυκήτων δεν είναι όμως απολύτως γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους. Ωστόσο, ο χαλκός, όπως και άλλα βαρέα μέταλλα ακόμα και σε μικρές ποσότητες είναι τοξικός για τους μύκητες όταν βρίσκεται σε μεγαλύτερες ποσότητες από τις απαιτούμενες για τις φυσιολογικές λειτουργίες. Η τοξικότητα μπορεί να προκύψει από μετουσίωση πρωτεϊνών μετά από αντίδραση του κατιόντος (Cu^{2+}) με σουλφυδρλικές και άλλες ομάδες (Ζιώγας 2010). Η καταστροφή της ημιπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης φαίνεται να είναι ένας ακόμη μηχανισμός μυκητοτοξικότητας του χαλκού.

Όσον αφορά τις άλλες δραστικές ουσίες που είναι εγκεκριμένες, το boscalid είναι και μία από τις πέντε δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκε και στη συγκεκριμένη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, το boscalid ανήκει στην ομάδα των καρβοξαμιδικών. Τα καρβοξαμιδικά είναι εξειδικευμένοι παρεμποδιστές του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το σύμπλοκο αυτό καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στο συνένζυμο Q. Τα καρβοξαμιδικά, παρεμβάλλονται στη ροή ηλεκτρονίων προς το συνένζυμο Q και έτσι διακόπτεται η μεταφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στο συνένζυμο Q και παρεμποδίζεται ο κύκλος του Krebs. Με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται η αναπνοή χωρίς να παρεμποδίζονται άλλες λειτουργίες του κυττάρου (Ζιώγας Β., Μάρκογλου Α., 2010).

Το dodine είναι μία δραστική ουσία εγκεκριμένη για την ανθράκωση η οποία ανήκει στις γουανιδίνες. Πρόκειται για μία παλιά δραστική ουσία που δρα επηρεάζοντας τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών και κατατάσσεται στα προστατευτικά μυκητοκτόνα που χρησιμοποιείται και για άλλες ασθένειες όπως το φουζικλάδιο και η φαιά σήψη (Ζιώγας Β., Μάρκογλου Α., 2010).

Εν συνεχεία το myclobutanil ανήκει στην ομάδα των τριαζολών, όπως και το cyproconazole που θα αναφερθεί παρακάτω και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως μυκητοκτόνο το 1989 με την εμπορική ονομασία Systhane και είναι αποτελεσματικό για αρκετές ομάδες μυκήτων όπως οι Ασκομύκητες, οι Βασιδιομύκητες και οι Αδηλομύκητες. Τα τριαζολικά αποτελούν υποομάδα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών, ευρέως γνωστοί και ως SBIs.

Τέλος, το pyraclostrobin όπως και το azoxystrobin που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, ανήκει στην ομάδα των στρομπιλουρινών, οι οποίοι είναι αναστολείς της μιτοχονδριακής αναπνοής και έτσι οδηγεί στη μείωση του ATP το οποίο συμμετέχει στις βασικές διεργασίες των κυττάρων στους μύκητες (FAO 2010).

1.5. Μελέτη ανθεκτικότητας του μύκητα *in vitro*

Τα τελευταία χρόνια ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που ταλανίζει το κλάδο της φυτοπροστασίας είναι αυτό της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αρκετές δραστικές ουσίες ή ομάδες μυκητοκτόνων. Η ανθεκτικότητα γίνεται αντιληπτή όταν ένα παθογόνο δεν ανταποκρίνεται σε κάποια δραστική ουσία δηλαδή όταν η ουσία αυτή δεν είναι αποτελεσματική πλέον στην καταπολέμηση του μύκητα. Η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται είτε στην αλόγιστη είτε στην αποκλειστική χρήση κάποιων δραστικών ουσιών οι οποίες είχαν κριθεί μέχρι τότε αποτελεσματικές και οδήγησαν έτσι στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών των μυκήτων (Brent and Hollomon, 2007).

Σε παγκόσμια κλίμακα έχουν αναφερθεί σημαντικά προβλήματα μειωμένης αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων πιθανόν λόγω της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών των φυτών στις διάφορες δραστικές ουσίες αλλά και της μειωμένης ευαισθησίας των μικροοργανισμών στα

φυτοφάρμακα. Παρά τις πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, υπάρχουν ακόμα κενά στα δεδομένα που υπάρχουν για τις ήδη γνωστές ομάδες μυκητοκτόνων όπως για παράδειγμα οι ανιλοπυριμιδίνες αλλά και για τις νεότερες ομάδες. Ο πιο κοινός μηχανισμός εμφάνισης ανθεκτικότητας είναι η αλλαγή στο βιοχημικό στόχο του μυκητοκτόνου. Για να ελεγχθεί η εμφάνιση ανθεκτικότητας των μυκήτων στις διάφορες δραστικές ουσίες και να μελετηθεί η γενετική βάση της ανθεκτικότητας, έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι ελέγχου της ανθεκτικότητας με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας (Beckerman, 2013).

Λόγω της σοβαρότητας του προβλήματος που έχει δημιουργηθεί με την ανθεκτικότητα έχει συσταθεί η FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) η οποία έχει ως σκοπό τη μελέτη της ανθεκτικότητας και των προβλημάτων που αυτή δημιουργεί, καθώς και την παροχή πληροφοριών για τη διαχείριση των σκευασμάτων ώστε να ελαττωθούν οι απώλειες λόγω της ανθεκτικότητας των μυκήτων αλλά και να διατηρηθεί παράλληλα η αποτελεσματικότητα της εκάστοτε δραστικής ουσίας (Ζιώγας Β., Μάρκογλου Α. 2010).

Μία σύγχρονη μέθοδος για τη μελέτη της ανθεκτικότητας και την ευαισθησία διαφόρων ειδών μυκήτων σε δραστικές ουσίες είναι αυτή της βιοδοκιμής με τη χρήση πλάκας μικροτιτλοδότησης (microtiter test). Πρόκειται για μία μέθοδο η οποία είναι γρήγορη, αποτελεσματική και ακριβής συγκριτικά με άλλες μεθόδους όπως είναι η μέτρηση του βλαστικού σωλήνα (Stammler and Sreakman 2006). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει περιγραφεί από τη FRAC όπου γίνεται μέτρηση της ανάπτυξης μυκηλίου του μύκητα μέσω της απορρόφησης του φωτός στο φασματοφωτόμετρο. Μέσα στα βοθρία της πλάκας μικροτιτλοδότησης τοποθετείται το αιώρημα σπορίων της εκάστοτε απομόνωσης του μύκητα και διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης μυκητοκτόνου όπου και αναμειγνύονται. Η πλάκα μικροτιτλοδότησης τοποθετείται σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός και υγρασίας όπου μετά από την επώαση τοποθετείται σε φασματοφωτόμετρο για να γίνει η μέτρηση (Pijls *et al.* 1994). Καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης οι πλάκες είναι σφραγισμένες έτσι ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις αλλά και εξάτμιση των διαλυμάτων (Stergiopoulos *et al.*, 2003). Η καμπύλη δόσης-απόκρισης

(EC50) μπορεί να οδηγήσει σε ικανοποιητικό και αξιόπιστο αποτέλεσμα σχετικά με την αποτελεσματικότητα του μυκητοκτόνου (Pijls *et al.*, 1994). Ως EC50 ορίζεται η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας η οποία είναι ικανή να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του μύκητα κατά 50% συγκριτικά με το μάρτυρα και υπολογίζεται με ανάλυση Probit. (Chen *et al.*, 2007, Rekanović, *et al.*, 2010).

Οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι εγκεκριμένες για την αντιμετώπιση της ανθράκωσης στη καρυδιά από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων αλλά χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση άλλων παθογόνων. Οι δραστικές ουσίες είναι οι εξής: cyproconazole, boscalid, fenhexamid, pyrimethanil και azoxystrobin. Το cyproconazole, όπως αναφέρθηκε παραπάνω ανήκει στην υποομάδα των τριαζολικών μυκητοκτόνων και είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός ακόρεστου αζωτοετεροκυκλικού δακτυλίου στο μόριό τους. Το fenhexamid είναι κυρίως μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείται κατά του βοτρύτη και εισήχθη στη γεωργία με την εμπορική ονομασία Teldor. Ανήκει στην ομάδα επίσης των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών (SBIs), στην υποομάδα των υδροξυανιλιδίων και δρα παρεμποδίζοντας συγκεκριμένα ενζυμικά στάδια της βιοσυνθετικής οδού των στερολών. Πιο συγκεκριμένα, παρεμποδίζει τα στάδια απομεθυλίωσης του C-4. Το cyproconazole δρα ως παρεμποδιστής της απομεθυλίωσης του C-14 (Ζιώγας Β., Μάρκογλου Α., 2010). Το fenhexamid δεν είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο και παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών αλλά όχι την βλάστηση των σπορίων.

Το pyrimethanil είναι ένα διασυστηματικό μυκητοκτόνο που ανήκει στην ομάδα των ανιλοπυριμιδινών και έχει προληπτική αλλά και θεραπευτική δράση σε Ασκομύκητες και Αδηλομύκητες. Δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης όμως από πειράματα προέκυψε ότι δεν παρεμποδίζεται η βλάστηση των σπορίων. Θεωρείται ότι παρεμποδίζεται η έκκριση των ενζύμων του μύκητα και τελικά ο μύκητας καταστρέφεται λόγω της έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι ο βιοχημικός μηχανισμός μυκητοτοξικής δράσης συνδέεται με την παρεμπόδιση της έκκρισης λυτικών ενζύμων τα οποία καταστρέφουν το κυτταρικό τοίχωμα των

φυτών και διευκολύνουν την προσβολή από το παθογόνο. Όσον αφορά το azoxystrobin ανήκει στην ομάδα Qo παρεμποδιστών και στην υποομάδα των στρουμπιλορινών οι οποίες έχουν εξειδικευμένη δράση στο σύμπλοκο III της αναπνευστικής οδού και για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν στη γεωργία το 1996. Οι Qo παρεμποδιστές δρουν στο κέντρο οξειδωσης της ουμπικινόλης. Πρόκειται για διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προληπτική και θεραπευτική δράση παρεμποδίζοντας τη βλάστηση των σπορίων του μύκητα, την ανάπτυξη του μυκηλίου και την παραγωγή των σπορίων σε πολλές ομάδες μυκήτων (Ζιώγας Β., Μάρκογλου Α., 2010).

1.6. Σκοπός διατριβής

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι κυρίως η μελέτη του μύκητα *Ophiognomonia leptostyla* που προκαλεί την ασθένεια της ανθράκωσης στη καρυδιάς. Ο συγκεκριμένος μύκητας δεν έχει μελετηθεί όσο άλλοι τόσο στη χώρα μας αλλά και στο εξωτερικό και γι' αυτό το λόγο και η παγκόσμια βιβλιογραφία είναι περιορισμένη. Πιο συγκεκριμένα λοιπόν, κύριος σκοπός αυτής της διατριβής είναι η μελέτη για την αντιμετώπιση της ασθένειας καθώς και η μελέτη του φαινοτύπου των απομονώσεων του παθογόνου αιτίου. Με αφορμή τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε πείραμα βιοδοκιμής με πλάκες μικροτιτλοδότησης όπου εξετάστηκε η ανθεκτικότητα των απομονώσεων καθώς και η αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιούμενων δραστικών ουσιών *in vitro*. Τέλος, εξετάστηκε και ο φαινότυπος του παθογόνου αιτίου όπου απεικονίζονται όλες οι απομονώσεις σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του μύκητα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο του έτους 2016 (Εικ. 1). Τα δείγματα αποτελούνταν κυρίως από φύλλα καρυδιάς τα οποία έφεραν φαίες πολυγωνικές κηλίδες όπου εμφανή είναι τα σχηματισμένα ακέρβουλα του μύκητα (Εικ. 2). Τα δείγματα συλλέχθηκαν από δύο περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας, τον Παλαμά Δομοκού Ν. Φθιώτιδας και την Μπούφα, Ν. Μαγνησίας (Πίν. 1). Στα δείγματα τα οποία λήφθηκαν από τον Παλαμά Δομοκού δεν είχαν πραγματοποιηθεί χημικές επεμβάσεις, ενώ στα δείγματα από την Μπούφα Μαγνησίας δεν υπάρχουν πληροφορίες για τυχόν επεμβάσεις στο παρελθόν.



Εικόνα 1: Φύλλα προσβεβλημένα από το μύκητα



Εικόνα 2: Σχηματισμένα ακέρβουλα πάνω σε προσβεβλημένο φύλλο καρυδιά

2.1.1. Μέθοδοι απομόνωσης του μύκητα και περιγραφή τους

Με τη μεταφορά των δειγμάτων στο χώρο του εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε στερεοσκοπική παρατήρησή τους. Για την απομόνωση του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν αρκετές μέθοδοι από τις οποίες τρεις ήταν αποτελεσματικές και περιγράφονται παρακάτω:

- Αρχικά η πρώτη μέθοδος με την οποία έγινε η απομόνωση ήταν αυτή με τη χρήση του υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) (Amiri, Saremi 2010) όπου τα μολυσμένα δείγματα που έφεραν τα ακέρβουλα κόπηκαν σε τμήματα διαστάσεων 0,5-1,0cm και εμβαπτίσθηκαν σε υποχλωριώδες νάτριο (0,5%) για 2 λεπτά. Αφού ξεπλύθηκαν σε απιονισμένο αποστειρωμένο νερό για 1 λεπτό στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για να στεγνώσουν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και έπειτα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα Potato Glycose Agar (PGA) με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνας. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 20°C. Κατόπιν έγινε μεταφορά μέρους του μυκηλίου σε νέο τρυβλίο Petri και σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Μία δεύτερη μέθοδος η οποία ήταν αποτελεσματική για την απομόνωση του συγκεκριμένου μύκητα είναι η μέθοδος με τη χρήση γέλης αγαρόζης (gel agarose) η οποία δεν περιγράφεται στη διεθνή βιβλιογραφία και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη συγκεκριμένη μελέτη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Αρχικά για τη δημιουργία διαλύματος αγαρόζης προστέθηκαν 0,045g αγαρόζης σε 2mL απιονισμένο αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια για τη παρασκευή διαλύματος στρεπτομυκίνης αναλογίας 1:1 προστέθηκαν 100mL στρεπτομυκίνης σε 100mL PGA από τα οποία 3μL μεταφέρθηκαν στο διάλυμα αγαρόζης. Έπειτα σε 2mL αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν μολυσμένα τμήματα φύλλων διαστάσεων 0,5cm και ανακινήθηκαν έτσι ώστε να απελευθερωθούν τα σπόρια στο διάλυμα. Αφαιρώντας στη συνέχεια τα τμήματα των φύλλων απέμεινε το διάλυμα σπορίων το οποίο προστέθηκε στο διάλυμα αγαρόζης και αφέθηκε να στερεοποιηθεί και ομογενοποιηθεί. Μόλις στερεοποιήθηκε το μίγμα, με μία σπάτουλα μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένες

αντικειμενοφόρους πλάκες όπου έγινε μικροσκοπική παρατήρηση των σπορίων του μύκητα και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα PGA και παρέμειναν στον επωαστικό θάλαμο στους 20°C.

- Η τρίτη μέθοδος απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διατριβή για πρώτη φορά και δεν αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι η μέθοδος της σταγόνας (ΣΤΑΓ). Στην περίπτωση αυτής της μεθόδου τα τμήματα των μολυσμένων φύλλων που είχαν μεταφερθεί στο χώρο του εργαστηρίου και είχαν παρατηρηθεί μακροσκοπικά ότι φέρουν ακέρβουλα στην επιφάνειά τους τοποθετούνταν σε αυτοσχέδιους υγρούς θαλάμους για 24-48 ώρες, έως ότου στα ακέρβουλα προκαλούνταν σχάση και ήταν πιο εύκολη η αποκόλληση τους από την επιφάνεια των φύλλων. Οι αυτοσχέδιο αυτοί υγροί θάλαμοι δημιουργήθηκαν ως εξής: Η κηλίδα του φύλλου που έφερε ακέρβουλα τοποθετήθηκε σε απολυμασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα και στερεώθηκε με κολλητική ταινία. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε, πάνω σε πλαστικά στηρίγματα, εντός τρυβλίου Petri το οποίο περιείχε απιονισμένο αποστειρωμένο νερό, με τέτοιο τρόπο ώστε η κηλίδα να μην έρχεται σε επαφή με το νερό. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24-48 ώρες, έως τη σχάση των ακέρβουλων. Με το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, τα τμήματα των φύλλων που έχουν τοποθετηθεί στις αντικειμενοφόρους πλάκες τοποθετήθηκαν στο στερεοσκόπιο όπου έγινε παρατήρηση των αλλαγών στη μορφολογία των ακέρβουλων. Στη συνέχεια σε μια απολυμασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα προστέθηκαν 30μL απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό και με μία αποστειρωμένη βελόνα μεταφέρθηκε το ακέρβουλο ακριβώς στο σημείο όπου τοποθετήθηκε η σταγόνα με το νερό και αναδεύτηκε ελαφρώς έτσι ώστε να ελευθερωθούν τα κονίδια. Έπειτα η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε στο μικροσκόπιο και έγινε παρατήρηση των κονιδίων. Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση η σταγόνα τοποθετήθηκε σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα PGA το οποίο παρέμεινε στον επωαστικό θάλαμο στους 20°C.

2.1.2. Ταυτοποίηση του μύκητα από προσβεβλημένα φύλλα καρυδιάς με συμπτώματα ανθράκωσης

Η ταυτοποίηση του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε όλες τις απομονώσεις με μικροσκοπική παρατήρησή τους. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά δημιουργήθηκαν μικροσκοπικά παρασκευάσματα από όλες τις απομονώσεις και έγινε παρατήρηση των σπορίων του μύκητα στο σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο Nikon Labophot-2 EFD3. Στο οπτικό μικροσκόπιο είναι ενσωματωμένη ψηφιακή φωτογραφική κάμερα με την οποία φωτογραφήθηκαν τα σπόρια σε μεγέθυνση 100x. Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση των διαστάσεων των σπορίων με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Adobe Photoshop CC (64 Bit).

2.1.3. Περιγραφή και διαχωρισμός των απομονώσεων του μύκητα *Marssonina juglandis* σε φαινοτύπους

Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης διατριβής πραγματοποιήθηκε παρατήρηση όλων των απομονώσεων και της ανάπτυξής τους από τη στιγμή της απομόνωσης έως τη στιγμή σποροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αρκετές διαφορές στον τρόπο ανάπτυξης της κάθε αποικίας και αρκετές διαφορές στο φαινότυπό τους. Όλες οι απομονώσεις που αναπτύσσονταν σε τρυβλία Petri στους 20°C είχαν τη χαρακτηριστική περιφερειακή ανάπτυξη βαμβακώδους μυκηλίου, λευκού έως υπόλευκου ή ακόμα και υποκίτρινου χρωματισμού, όπου σε κάποιες από αυτές στην πλήρη ανάπτυξη έφτανε έως και τα 9cm διάμετρο.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε φωτογραφική αποτύπωση μερικών απομονώσεων που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία. Στο φωτογραφικό υλικό παρουσιάζονται απεικονίσεις των απομονώσεων από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των μυκηλιακών υφών (10 περίπου ημέρες από την ημέρα της μεταφοράς) έως και το στάδιο της σποριοποίησης του μύκητα (45 περίπου ημέρες από την ημέρα της μεταφοράς). Για κάθε απομόνωση παρουσιάζονται 3 φωτογραφίες από διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης της αποικίας. Η μυκηλιακή αποικία αναπτύσσεται κυκλικά και οι μυκηλιακές υφές επεκτείνονται περιφερειακά καλύπτοντας ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου. Η ανάπτυξη του μυκηλίου στο τελικό στάδιο, στάδιο σποριοποίησης, έφτασε σε κάποιες από τις απομονώσεις έως και τα 9cm διάμετρο. Το σύνολο των φωτογραφιών παρουσιάζεται αναλυτικά στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

2.2. Εξαγωγή DNA από απομονώσεις του μύκητα *Marssonina juglandis*

Για την απομόνωση του DNA από τις συνολικά 35 απομονώσεις του μύκητα, όλες οι απομονώσεις τοποθετήθηκαν αρχικά σε υγρές καλλιέργειες. Η μέθοδος καθαρισμού του DNA που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Doyle and Doyle (1990). Αρχικά, κάτω από στείρες συνθήκες, πραγματοποιήθηκε μεταφορά ενός τμήματος της ανεπτυγμένης αποικίας από τρυβλίο Petri σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα PGB (Potato Glycose Broth) (Sambrook *et al* 1989). Στη συνέχεια οι υγρές καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 20°C για περίπου 10-15 ημέρες, όπου ανακινούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα ελαφρώς και χειροκίνητα.

Έπειτα, η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε στις 4500 στροφές για 15 λεπτά, από το σωλήνα φυγοκέντρησης απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί για να στεγνώσει. Από το ίζημα ζυγίστηκαν 200mg του μυκηλίου, τα οποία μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης. Στα 200mg μυκηλίου προστέθηκαν 400μL διαλύματος εξαγωγής (CTAB- 60mL απιονισμένο νερό, 2g hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), 28mL NaCl 5M, 4mL

διαλύματος Disodium Ethylenediaminetetraacetate, 2 H₂O (EDTA) 0,5M, 5mL Tris HCl, 0,2mL 2-mercaptoethanol) και 25mg Polyvinylpyrrolidone (PVP) 25, ο ιστός ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια micropestle και παρέμεινε για 25 λεπτά στους 60°C στο υδατόλουτρο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μL φαινόλης και 200μL χλωροφορμίου. Μετά ακολούθησε ανάδευση για 1 λεπτό και προέκυψε αιώρημα σε μορφή γαλακτώματος, το οποίο φυγοκεντρήθηκε για άλλα 10 λεπτά στις 13000 στροφές. Μετά τη φυγοκέντρηση, ακολούθησε μεταφορά 200μL του υπερκείμενου σε νέο μικροσωληνίσκο των 2mL, όπου προστέθηκαν 200μL του NaCl και 800μL αιθυλική αλκοόλη (EtOH) 95% και ακολουθούσε ανάδευση κάθε φορά. Το μείγμα παρέμεινε στους -20°C για περίπου 24 ώρες.

Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση του μίγματος για 10 λεπτά στις 13000 στροφές. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίφθηκε το υπερκείμενο τμήμα και προστέθηκε 1mL αιθυλικής αλκοόλης (EtOH) 70%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000 στροφές και κατόπιν απόρριψη της αιθυλικής αλκοόλης και σχηματισμός ιζήματος (*pellet*). Για να εξατμιστεί πλήρως η αιθυλική αλκοόλη, τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά. Με το πέρας των 30 λεπτών, στο ίζημα προστέθηκαν 50-100μL απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος σε κάθε δείγμα. Τέλος όλα τα δείγματα αφού πρώτα αναδεύτηκαν καλά αποθηκεύτηκαν στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της συγκέντρωσης καθώς και της καθαρότητας του DNA κάθε δείγματος.

Μετά τη διαδικασία εξαγωγής του DNA, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας όλων των δειγμάτων ένα προς ένα σε φασματοφωτόμετρο (Unikon Spectrophotometer 922, Kontron instruments) και απορροφήσεις 260 και 280nm. Ο λόγος 260/280 των παραπάνω απορροφήσεων αποτελεί την καθαρότητα του DNA και για να θεωρηθεί καθαρό το DNA που μετράται πρέπει οι τιμές που παρουσιάζονται να κυμαίνονται από 1,8 έως 2, ενώ η ποσότητα του DNA μετράται με το τύπο $OD_{260} * 1000$ όπου OD_{260} η ένδειξη του φασματοφωτομέτρου στα 260nm (Sambrook *et al.* 1989). Παρατηρήθηκε πως σε όλες τις απομονώσεις που εξετάστηκαν η καθαρότητα και η ποσότητα του DNA ήταν σε πολύ θετικά επίπεδα χωρίς όμως να έχει πραγματοποιηθεί περαιτέρω γενετική μελέτη.

2.3. Πείραμα ελέγχου ανθεκτικότητας και αποτελεσματικότητας των δραστικών ουσιών *in vitro*

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας σε διάφορες ομάδες μυκητοκτόνων χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά σκευάσματα με τις εξής πέντε δραστικές ουσίες: Cyproconazole (Atemi 10WG 10% β/β, βοηθητικές ουσίες 89.4% β/β), που ανήκει στην ομάδα των τριαζολών, Boscalid (Bellys gold formerly nicobifen 26.7WG 26.7%, pyraclostrobin 6.7% β/β, βοηθητικές ουσίες 65.3% β/β), που ανήκει στην ομάδα των καρβοξαμιδικών, Fehnexamid (Teldor 50 WG 51% β/β, βοηθητικές ουσίες 46.3% β/β) , που ανήκει στην ομάδα των υδροξυανιλιδίων, Pyrimethanil (Scala 40SC 40% β/ο, βοηθητικές ουσίες 61.66% β/β), που ανήκει στην ομάδα των ανιλοπυριμιδινών, και Azoxystrobin (Mirador 25SC 25% β/ο, βοηθητικές ουσίες 76.2% β/β) που ανήκει στην ομάδα των στρομπιλουρινών. Χρησιμοποιήθηκε μία δραστική ουσία για κάθε μία από τις ομάδες μυκητοκτόνων. Οι δραστικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, κατά τη διάρκεια του πειράματος ελέγχου ανθεκτικότητας, δεν είναι εγκεκριμένες από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για την αντιμετώπιση της ανθράκωσης στη καρυδιά. Οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν μόνο για πειραματικούς σκοπούς και δεν συνίσταται η χρήση τους για τη καταπολέμηση της ασθένειας χωρίς την έγκριση από το αρμόδιο υπουργείο. Οι πέντε δραστικές ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν μετά από αραιώση τους στις εξής πέντε συγκεντρώσεις 0,001 , 0,01, 0,1, 1 και 10mgL⁻¹. Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PGB.

In vitro έλεγχος των απομονώσεων του μύκητα *Gnomonia leptostyla* πραγματοποιήθηκε με βάση πρωτόκολλο της FRAC που χρησιμοποιείται για διαφορετικούς φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Fungicide Resistance Action Committee) (Sierotzki 2006, Stammer *et al.* 2008) με κάποιες τροποποιήσεις του αρχικού πρωτοκόλλου εφόσον δεν υπήρξε βιβλιογραφική αναφορά υλοποίησης παρόμοιας έρευνας για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Πρέπει να αναφερθεί ότι για την υλοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν όλες οι απομονώσεις του

μύκητα που είχαν καλλιεργηθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες στον επωαστικό θάλαμο στους 20°C οι οποίες είχαν σποροποιηθεί με το πέρας περίπου 43 ημερών. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε πραγματοποιήθηκε σε τρία βασικά στάδια. Να σημειωθεί ότι κάθε φορά που πραγματοποιούνταν οι πλάκες μικροτιτλοδότησης δημιουργούνταν τα αρχικά διαλύματα των μυκητοκτόνων και δεν αποθηκεύονταν για μελλοντική χρήση προς αποφυγή πιθανής φωτοδιάσπασης ή υδατοδιάλυσής τους. Πρώτο στάδιο αυτής της διαδικασίας ήταν η δημιουργία των αρχικών διαλυμάτων των μυκητοκτόνων καθώς και των πέντε συγκεντρώσεων στις οποίες θα γινόταν η αραίωσή τους, σε θρεπτικό υπόστρωμα PGB, σε όσο το δυνατόν απολυμασμένες συνθήκες. Δεύτερο στάδιο ήταν η δημιουργία του υγρού αιωρήματος των σπορίων. Πιο συγκεκριμένα, στην αποικία του παθογόνου που βρισκόταν σε δοκιμαστικό σωλήνα, γινόταν προσθήκη 10mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος PGB και με τη χρήση βακτηριολογικού κρίκου και πίεση της αποικίας έσπαγαν τα σχηματισμένα ακέρβουλα και απελευθερώνονταν τα κονίδια στο διάλυμα.

Σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια (τύπου McCartney), στο άνοιγμα των οποίων προσαρμόζονταν αποστειρωμένο χωνί, τοποθετούνταν αποστειρωμένο τουλπάνι επάνω στο χωνί για να κατακρατούνται τα τμήματα του μυκηλίου και των κατεστραμμένων ακέρβουλων που είχαν προκύψει από τη δημιουργία του αιωρήματος και να περάσει το υγρό αιώρημα που περιέχει τα σπόρια στο φιαλίδιο. Η συγκέντρωση των σπορίων μετρούνταν με τη βοήθεια του αιματοκυττόμετρου (Neubauer, Rhône-Poulenc). Η τελική συγκέντρωση των σπορίων ήταν 10^4 σπόρια/mL και η επίτευξη της τελικής συγκέντρωσης γινόταν με αραίωση του αρχικού αιωρήματος.

Τρίτο στάδιο ήταν η διαδικασία σύνθεσης της πλάκας μικροτιτλοδότησης (πλάκα ELISA). Σε κάθε πλάκα έγινε δοκιμή της αποτελεσματικότητας των πέντε δραστικών ουσιών σε μία απομόνωση και σε τρεις επαναλήψεις κάθε συγκέντρωσης της εκάστοτε δραστικής ουσίας στην οποία προστέθηκε και αιώρημα σπορίων.

Για κάθε απομόνωση χρησιμοποιούνταν δύο πλάκες μικροτιτλοδότησης, εκ των οποίων η μία μετριόταν τη μέρα δημιουργίας της (ώρα μηδέν) και η δεύτερη ακριβώς μετά από δέκα ημέρες αφού

τοποθετούνταν κατευθείαν στο θάλαμο επώασης στους 20°C. Σε κάθε βοθρίο της πλάκας περιέχονταν συνολικός όγκος διαλύματος 200μL με PGB και αιώρημα σπορίων ή αιώρημα σπορίων και διάλυμα δραστικής ουσίας. Πιο συγκεκριμένα, η πλάκα μικροπιλοδότησης διέθετε 96 βοθρία (A, B, C, D, E, F, G, H x 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) τα οποία πληρώθηκαν όπως ακριβώς φαίνεται στο διάγραμμα παρακάτω (Πίν. 1):

Πίνακας 1: Πλάνο της πλάκας μικροπιλοδότησης για τη δοκιμή in vitro της αποτελεσματικότητας δραστικών ουσιών όπως εφαρμόστηκε

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PGB	Bosc 10	Azox 10	Cyp 0,01	Cyp 1	Bosc 0,01	Bosc 10	Fenh 0,01	Fenh 10	Pyr 0,1	Pyr 10	Azox 0,1
B	PGB	Fenh 10	Azox 10	Cyp 0,01	Cyp10	Bosc 0,01	Bosc 10	Fenh 0,1	Fenh 10	Pyr 0,1	Azox 0,001	Azox 0,1
C	PGB	Fenh 10	PGB+ ΣΠΟΡΙΑ	Cyp 0,01	Cyp 10	Bosc 0,1	Bosc 10	Fenh 0,1	Pyr 0,001	Pyr 0,1	Azox 0,001	Azox 1
D	Cyp 10	Fenh 10	PGB+ ΣΠΟΡΙΑ	Cyp 0,1	Cyp 10	Bosc 0,1	Fenh 0,001	Fenh 0,1	Pyr 0,001	Pyr 1	Azox 0,001	Azox 1
E	Cyp 10	Pyr 10	PGB+ ΣΠΟΡΙΑ	Cyp 0,1	Bosc 0,001	Bosc 0,1	Fenh 0,001	Fenh 1	Pyr 0,001	Pyr 1	Azox 0,01	Azox 1
F	Cyp 10	Pyr 10	Cyp 0,001	Cyp 0,1	Bosc 0,001	Bosc 1	Fenh 0,001	Fenh 1	Pyr 0,01	Pyr 1	Azox 0,01	Azox 10
G	Bosc 10	Pyr 10	Cyp 0,001	Cyp 1	Bosc 0,001	Bosc 1	Fenh 0,01	Fenh 1	Pyr 0,01	Pyr 10	Azox 0,01	Azox 10
H	Bosc 10	Azox 10	Cyp 0,001	Cyp 1	Bosc 0,01	Bosc 1	Fenh 0,01	Fenh 10	Pyr 0,01	Pyr 10	Azox 0,1	Azox 10

Τα βοθρία A1-E3 χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Ως PGB: υγρό θρεπτικό μέσο Potato Glycose Broth , Cyp 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Cyproconazole , Bosc 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Boscalid, Fenh 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Fenhexamid, Pyr 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Pyrimethanil, Azox 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Azoxystrobin, PGB+ ΣΠΟΡΙΑ: Είναι το αιώρημα των σπορίων σε υγρό θρεπτικό υλικό PGB. Το θρεπτικό υλικό PGB χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας για να ελεγχθεί αν υπάρχει κάποια επιμόλυνση στο θρεπτικό υλικό. Τα διαλύματα των δραστικών ουσιών στις μέγιστες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η απορρόφηση των δραστικών ουσιών στις μέγιστες συγκεντρώσεις και αν τα διαλύματα των μυκητοκτόνων είναι απαλλαγμένα από επιμολύνσεις. Το θρεπτικό υλικό PGB με το αιώρημα σπορίων χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η ανάπτυξη του μυκηλίου για όλες τις απομονώσεις. Στα βοθρία F3-H12 χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα του αιωρήματος σπορίων του μύκητα και των πέντε δραστικών ουσιών στις πέντε συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (σε τρεις επαναλήψεις η κάθε συγκέντρωση). Cyp 0,001: Είναι η δραστική ουσία Cyproconazole σε συγκέντρωση (0,001mg/L) με αιώρημα σπορίων, Cyp 0,01: Είναι η δραστική ουσία Cyproconazole σε συγκέντρωση (0,01mg/L) με αιώρημα σπορίων, Cyp 0,1: Είναι η δραστική ουσία Cyproconazole σε συγκέντρωση (0,1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Cyp 1: Είναι η δραστική ουσία Cyproconazole σε συγκέντρωση (1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Cyp 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Cyproconazole με αιώρημα σπορίων, Bosc 0,001: Είναι η δραστική ουσία Boscalid σε συγκέντρωση (0,001mg/L) με αιώρημα σπορίων, Bosc 0,01: Είναι η δραστική ουσία Boscalid σε συγκέντρωση (0,01mg/L) με αιώρημα σπορίων, Bosc 0,1: Είναι η δραστική ουσία Boscalid σε συγκέντρωση (0,1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Bosc 1: Είναι η δραστική ουσία Boscalid σε συγκέντρωση (1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Bosc 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Boscalid με αιώρημα σπορίων, Fenh 0,001: Είναι η δραστική ουσία Fenhexamid σε συγκέντρωση (0,001mg/L) με αιώρημα σπορίων, Fenh 0,01: Είναι η δραστική ουσία Fenhexamid σε συγκέντρωση (0,01mg/L) με αιώρημα

σπορίων, Fenh 0,1: Είναι η δραστική ουσία Fenhexamid σε συγκέντρωση (0,1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Fenh 1: Είναι η δραστική ουσία Fenhexamid σε συγκέντρωση (1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Fenh 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Fenhexamid με αιώρημα σπορίων, Pyr 0,001: Είναι η δραστική ουσία Pyrimethanil σε συγκέντρωση (0,001mg/L) με αιώρημα σπορίων, Pyr 0,01: Είναι η δραστική ουσία Pyrimethanil σε συγκέντρωση (0,01mg/L) με αιώρημα σπορίων, Pyr 0,1: Είναι η δραστική ουσία Pyrimethanil σε συγκέντρωση (0,1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Pyr 1: Είναι η δραστική ουσία Pyrimethanil συγκέντρωση σε (1mg/L) με αιώρημα σπορίων, Pyr 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Pyrimethanil με αιώρημα σπορίων, και τέλος Azox 0,001: Είναι η δραστική ουσία Azoxystrobin σε συγκέντρωση (0,001mg/L) με αιώρημα σπορίων, Azox 0,01: Είναι η δραστική ουσία Azoxystrobin σε συγκέντρωση (0,01mg/L) με αιώρημα σπορίων, Azox 0,1: Είναι η δραστική ουσία Azoxystrobin σε συγκέντρωση (0,1mg L⁻¹) με αιώρημα σπορίων, Azox 1: Είναι η δραστική ουσία Azoxystrobin σε συγκέντρωση (1mg/L) με αιώρημα σπορίων και Azox 10: Είναι η μέγιστη συγκέντρωση (10mg/L) της δραστικής ουσίας Azoxystrobin με αιώρημα σπορίων.

Με την ολοκλήρωση του πειραματικού σταδίου πραγματοποιήθηκε μέτρηση όλων των πλακών μικροτιτλοδότησης με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου ELISA (Biotek ELx808-ELISA plate reader), το οποίο ήταν διαθέσιμο στο Εργαστήριο Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε απορρόφηση των 405nm. Η μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο αφορά την απορρόφηση του μυκηλίου για κάθε απομόνωση και καθορίζει την ανάπτυξή του στο χρονικό διάστημα των δέκα ημερών. Τέλος, έγινε στατιστική ανάλυση Probit των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows 10, Version 23) και έγινε καταγραφή της τιμής του EC50 για όλες τις απομονώσεις.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Συλλογή των δειγμάτων

Όπως αναφέρεται σε προηγούμενο κεφάλαιο η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας και ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 35. Παρακάτω φαίνεται το σύνολο των απομονώσεων και οι περιοχές στις οποίες συλλέχθηκαν.

Πίνακας 2: Κωδικοί όλων των απομονώσεων και οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκαν.

Περιοχή Συλλογής	Κωδικός απομόνωσης
Παλαμάς , Νομός Φθιώτιδας	1 _A , 2 _A , 4 _B , 5 _B , 8 _B , 9 _B , 10 _A , 11 _B , 12 _A , 13 _A , 15 _B , 18 _A , 19 _A , 21 _A , 22 _A , 23 _B , 24 _A , 25 _A , 26 _B , 27 _B , 28 _B , 29 _B , 30 _B , 31 _B , 32 _B , 33 _B , 36 _A
Μπούφα, Νομός Μαγνησίας	3 _A , 7 _B , 14 _A , 16 _B , 17 _B , 20 _A , 35 _A , 37 _A

Η παρατήρηση και η ταυτοποίηση όλων των απομονώσεων του μύκητα *Ophiognomonia leptostyla* πραγματοποιήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο (Εικ. 3). Έγινε παρατήρηση των κονιδίων του μύκητα και μέτρηση των διαστάσεών τους. Οι διαστάσεις των κονιδίων διέφεραν ανά απομόνωση αλλά οι διαστάσεις τους αντιστοιχούσαν στις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία διαστάσεις (19-28μm x 2-5μm) (Εικ. 4). Στη παρατήρηση που έγινε στο μικροσκόπιο, τα σπόρια ήταν δικύτταρα, άχρωμα και τοξοειδή. Αρχικά, είναι μονοκύτταρα αλλά στη συνέχεια γίνονται δικύτταρα με οξεία κατάληξη στα άκρα. Στο μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν και μονοκύτταρα κονίδια τα οποία στη συνέχεια καθίσταντο δικύτταρα (Εικ. 5).



Εικόνα 3: Δικότταρα κονίδια του μύκητα *Marssonina juglandis* (Μεγέθυνση 200x)



Εικόνα 4: Μέτρηση των διαστάσεων των κονιδίων του μύκητα (Μεγέθυνση 200x)



Εικόνα 5: Μονοκύτταρα κονίδια πριν καθιστούν δικύτταρα (Μεγέθυνση 200x)

3.2. Ανάπτυξη των απομονώσεων του μύκητα *Ophiognomonia leptostyla* σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα

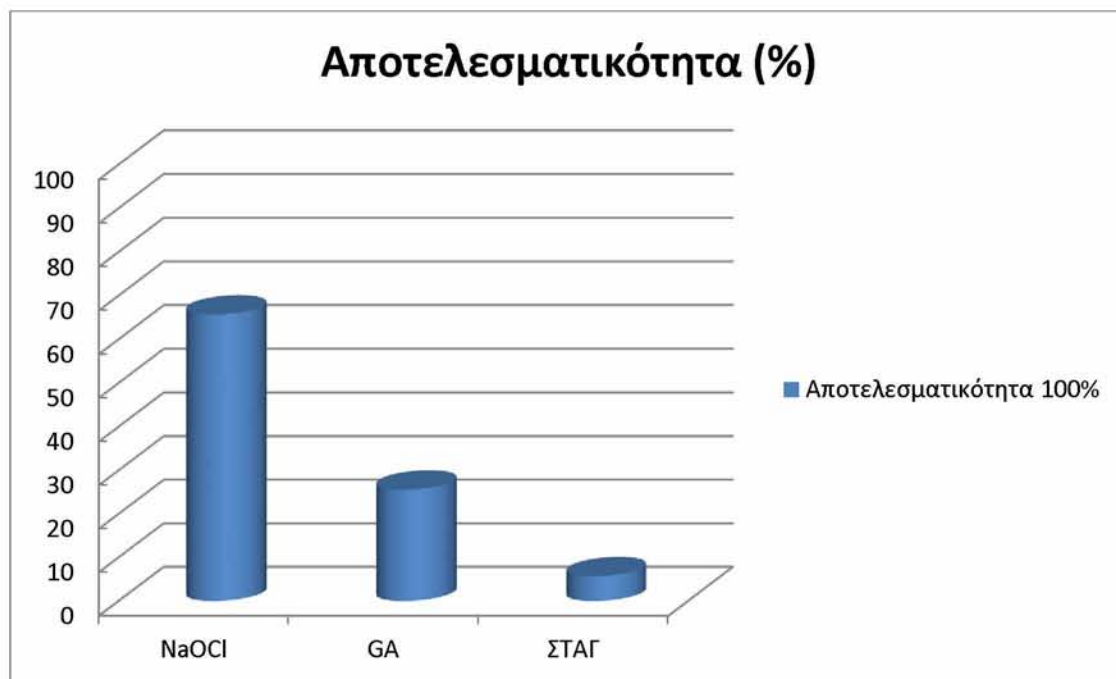
Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η απομόνωση του μύκητα πραγματοποιήθηκε με τρεις μεθόδους. Κατά τη μέθοδο NaOCl τα προσβεβλημένα φύλλα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα PGA με τη βοήθεια βακτηριολογικής βελόνας και στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο θερμοκρασίας 20°C. Με τον ίδιο τρόπο κατά τη μέθοδο απομόνωσης gel agarose, τα τμήματα γέλης που περιείχαν τα κονίδια και στερεοποιήθηκαν τοποθετήθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο σε τρυβλία Petri σε επωαστικό θάλαμο των 20°C. Τέλος, κατά τη τρίτη μέθοδο της σταγόνας, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τις δύο προηγούμενες μεθόδους και οι σταγόνες στις οποίες εμπεριέχονται τα κονίδια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri και στη συνέχεια στους 20°C. Με το πέρασμα 15 ημερών η καλλιέργεια του μύκητα είχε αναπτυχθεί αρκετά. Με το πέρασμα ενός μήνα η ανάπτυξη του μύκητα ήταν ικανοποιητική χωρίς όμως να έχει παρατηρηθεί μέχρι εκείνη τη χρονική στιγμή σποριοποίηση του μύκητα. Η πρώτη απομόνωση στην οποία παρατηρήθηκε σποριοποίηση του μύκητα ήταν σε χρονικό διάστημα 43 ημερών από την ημέρα εμβολιασμού. Ο μέσος όρος σποριοποίησης όλων των απομονώσεων είναι 41 ημέρες. Μεταφορά

του μυκηλίου σε νέο τρυβλίο έγινε όταν η αποικία στο τρυβλίο είχε διάμετρο περίπου 2-3cm.

3.3. Αποτελεσματικότητα των μεθόδων απομόνωσης του μύκητα

Η απομόνωση του μύκητα *Gnomonia leptostyla* πραγματοποιήθηκε, όπως αναφέρεται και σε προηγούμενο κεφάλαιο, με τρεις διαφορετικές μεθόδους. Και οι τρεις μέθοδοι είχαν θετικά αποτελέσματα και αποτέλεσαν ένα σημαντικό κομμάτι του πειραματικού μέρους της διατριβής χωρίς όμως το ποσοστό επιτυχίας να είναι το ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η πιο επιτυχή από τις μεθόδους είναι αυτή της απομόνωσης με υποχλωριώδες νάτριο. Από τις 35 απομονώσεις οι 23 πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο του υποχλωριώδους νατρίου, οι 10 με τη μέθοδο γέλης αγαρόζης και μόνο οι 2 απομονώσεις με τη μέθοδο της σταγόνας. Έπειτα από πολλές δοκιμές και αποτυχημένες προσπάθειες απομόνωσης του μύκητα με διάφορες μεθόδους, τα ποσοστά αποτελεσματικότητας όσον αφορά συγκριτικά τις 3 μεθόδους μεταξύ τους είναι: μέθοδος με το υποχλωριώδες νάτριο 65.7%, μέθοδος με τη γέλη αγαρόζης 25.6% και με μέθοδο της σταγόνας μόλις 5.7% στο σύνολο των 35 απομονώσεων (Διάγρ. 1). Όλες οι απομονώσεις αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες. Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων απομόνωσης του μύκητα δεν επηρεάστηκαν από τη περιοχή συλλογής των δειγμάτων. Επίσης η επιλογή της μεθόδου απομόνωσης είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας. Ένας άλλος παράγοντας που δεν επηρεάζει την επιλογή μεθόδου απομόνωσης είναι το φως.

Η μέθοδος με το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) αποτελεί μία από τις βασικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους απομόνωσης του συγκεκριμένου μύκητα (Amiri, Saremi 2010). Η αποτελεσματικότητά της συγκεκριμένης μεθόδου είναι αναγνωρισμένη παγκοσμίως γεγονός που δικαιολογεί και το μεγάλο ποσοστό επιτυχίας στη συγκεκριμένη μελέτη. Όσον αφορά τις άλλες δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη συγκεκριμένη μελέτη, ήταν επιτυχείς μιας και στις απομονώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν, η ανάπτυξη του μύκητα ήταν εξίσου καλή με τις υπόλοιπες απομονώσεις.



Διάγραμμα 1: Αποτελεσματικότητα επί της % συγκριτικά των τριών μεθόδων απομόνωσης

3.4. Φαινότυπος μυκηλιακής ανάπτυξης

Η μελέτη του φαινοτύπου του μύκητα *Gnomonia leptostyla in vitro* έγινε για πρώτη φορά και παρουσιάζεται παρακάτω με μία φωτογραφική παρουσίαση. Κάθε απομόνωση απεικονίζεται σε τρία διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Το πρώτο είναι το αρχικό στάδιο ανάπτυξης όπου απεικονίζεται ο μύκητας σε ανάπτυξη έως και 10 ημέρες από την ημέρα της μεταφοράς σε νέο τρυβλίο Petri. Στο δεύτερο στάδιο ανάπτυξης παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μυκηλίου σε χρονικό διάστημα έως και 20 ημέρες και τέλος είναι το στάδιο απεικόνισης του μύκητα στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί η σποριοποίηση δηλαδή το διάστημα περίπου 40 ημέρες από τη στιγμή απομόνωσης του μύκητα.

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις του φαινοτύπου σε όλες τις απομονώσεις. Οι διαφοροποιήσεις αυτές αφορούν την ανάπτυξη του μυκηλίου, το χρόνο ανάπτυξης, το χρωματισμό της εκάστοτε απομόνωσης καθώς και τον τελικό σχηματισμό των μυκηλιακών υφών στα τρυβλία.

Με βάση τις φαινοτυπικές διαφορές που παρατηρήθηκαν σε όλες τις απομονώσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης, δημιουργήθηκαν 4 φαινοτυπικές ομάδες στις οποίες κατηγοριοποιήθηκαν και οι 35 απομονώσεις και στις οποίες περιγράφονται αναλυτικά οι φαινοτυπικές διαφοροποιήσεις και τα χαρακτηριστικά της καθεμιάς. Αυτή η ταξινόμηση των απομονώσεων σε φαινοτυπικές ομάδες δεν περιγράφεται στη παγκόσμια βιβλιογραφία και υλοποιήθηκε για πρώτη φορά στη συγκεκριμένη μελέτη. Οι ονομασίες των φαινοτύπων που δόθηκαν σε κάθε ομάδα είναι χαρακτηριστικές της μορφής με την οποία αναπτύσσονται οι απομονώσεις στα τρυβλία Petri. Οι 4 φαινοτυπικές ομάδες είναι οι εξής:

a. Φαινότυπος **‘Δαντέλα’**

Σε αυτή την ομάδα η ανάπτυξη του μυκηλίου ήταν περιφερειακή, σε κυκλική μορφή. Πρόκειται για δαντελωτή περιφέρεια όπου δημιουργήθηκαν υφές σε δακτυλιωτή μορφή όπου στο τελείωμα της περιφέρειας κατέληγε σε ακανόνιστη μορφή με εσοχές που θυμίζουν δαντέλα.

b. Φαινότυπος **‘Κύκλος’**

Σε αυτή την ομάδα η ανάπτυξη του μυκηλίου έγινε κυκλικά. Δεν ακολουθείται συγκεκριμένο μοτίβο και η ανάπτυξη του μύκητα γίνεται σε όλη την έκταση του τρυβλίου περιμετρικά, σχηματίζοντας λεπτούς κύκλους οι οποίοι δεν είναι πολύ εύκολα διακριτοί με γυμνό οφθαλμό.

c. Φαινότυπος **‘Βαμβακώδης ή κυματοειδής δακτύλιος’**

Στη τρίτη ομάδα παρατηρήθηκε σχηματισμός δακτυλίων κατά την ανάπτυξη του μυκηλίου εμφανώς σχηματισμένοι σε κυματοειδή μορφή και βαμβακώδη επιφάνεια παρατηρούμενη πολύ πιο έντονα απ’ ότι στις υπόλοιπες ομάδες φαινοτύπων. Οι μυκηλιακές υφές αναπτύσσονταν προς τα πάνω με πάχος περίπου 2-3mm.

d. Φαινότυπος **‘Ομόκεντροι κύκλοι’**

Στη τέταρτη και τελευταία ομάδα παρατηρήθηκε περιφερειακή ανάπτυξη του μυκηλίου στο τρυβλίο όπου δημιουργήθηκαν εμφανείς ομόκεντροι κύκλοι. Η σποροποίηση των απομονώσεων που κατατάχθηκαν σε

αυτή την κατηγορία πραγματοποιήθηκε σε ελαφρώς μικρότερο χρονικό διάστημα (2 με 3 ημέρες νωρίτερα) συγκριτικά με τις υπόλοιπες απομονώσεις. Η ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών κάλυπτε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου και έφτανε έως και τα 9cm.

Όλες οι απομονώσεις επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας (20°C) και σχετικής υγρασίας και παρέμειναν σε συνεχές σκότος καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Οι απομονώσεις κατηγοριοποιήθηκαν όπως ακριβώς παρουσιάζονται στο πίνακα 3:

Πίνακας 3: Κατηγοριοποίηση των απομονώσεων ανά φαινότυπο

Δαντέλα	2 _A	8 _B	11 _B	21 _A	22 _A	27 _A	28 _B	29 _B	30 _B	36 _A
Κύκλος	4 _B	9 _B	10 _A	12 _A	13 _A	15 _B	23 _B	24 _A	31 _B	37 _A
Βαμβακώδες/κυματοειδής δακτύλιος	3 _A	7 _B	14 _A	16 _B	17 _B	18 _A	19 _A	25 _A	33 _B	
Ομόκεντροι κύκλοι	1 _A	5 _B	20 _A	26 _B	32 _B	35 _A				

Οι μέθοδοι απομόνωσης καθώς και οι περιοχές συλλογής δεν επηρέασαν το σχηματισμό των μυκηλιακών υφών *in vitro*. Οι συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός και σχετικής υγρασίας παρέμειναν σταθερές στο θάλαμο επώασης. Όμως στις διαφοροποιήσεις αυτές πιθανόν να παίζουν ρόλο οι στιγμιαίες εναλλαγές των παραπάνω συνθηκών λόγω μεταφοράς των απομονώσεων σε συνθήκες δωματίου. Εφόσον οι συνθήκες ανάπτυξης παρέμειναν σταθερές και το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν το ίδιο σε όλες τις απομονώσεις καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξής τους, αυτή η διαφοροποίηση στο φαινότυπο πιθανόν να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες οι οποίοι δεν μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη.

Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος χρόνος που χρειάστηκε για την ανάπτυξη του μυκηλίου στο τρυβλίο ήταν 5 ημέρες από την ημέρα εμβολιασμού. Παρατηρήθηκε σποριοποίηση του μύκητα για πρώτη φορά με το πέρασμα 43

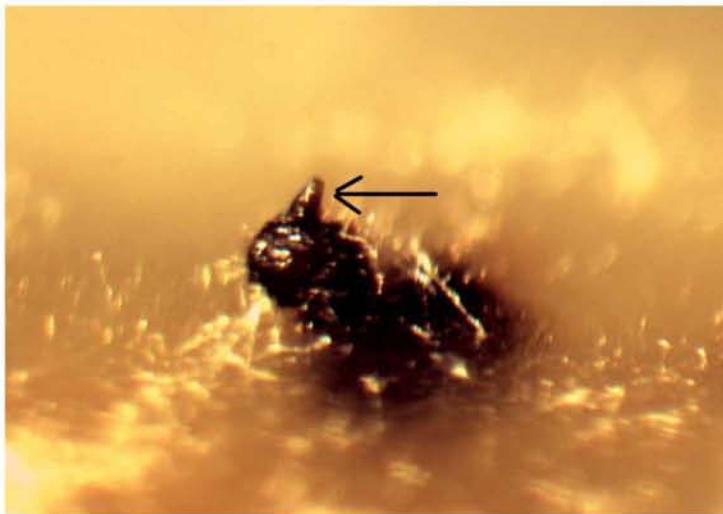
ημερών από την ημέρα του εμβολιασμού στην απομόνωση 19. Ο μέσος χρόνος σποριοποίησης του μύκητα για όλες τις απομονώσεις ήταν 41 ημέρες από την ημέρα του εμβολιασμού μέχρι την πρώτη παρατήρηση μικροσκοπικά των παραγόμενων από τα ακέρβουλα σπορίων.

Οι διαστάσεις των μυκηλιακών υφών κατά την ανάπτυξη του μύκητα στα τρυβλία ποικίλουν και δεν είναι σταθερές ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης. Η ανάπτυξη του μυκηλίου θεωρείται κυκλική και επεκτείνεται περιφερειακά από το κέντρο του τρυβλίου Petri έως και διάμετρο 9cm, καλύπτοντας όλη σχεδόν την επιφάνεια του τρυβλίου σε διάστημα 25 έως 30 ημερών. Οι απομονώσεις δεν διέφεραν σε χρωματισμό. Το χρώμα του μυκηλίου σε όλες τις απομονώσεις ήταν λευκό, υπόλευκο και καθώς προχωρούσε η ανάπτυξη το μυκήλιο αποκτούσε πιο σκούρο χρωματισμό κυρίως στο κέντρο της αποικίας. Η ανάπτυξη των αποικιών δεν επηρεάστηκε από τον φαινότυπο καθώς σε όλες τις απομονώσεις η ανάπτυξη προχωρούσε κατά τον ίδιο τρόπο με μόνη διαφοροποίηση στο τελικό στάδιο ανάπτυξής του μυκηλίου όπου και παρατηρήθηκε η εμφανής διάκριση των φαινοτύπων.

Πραγματοποιήθηκε επίσης μεταφορά των απομονώσεων σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου μετά τη σποριοποίηση του μύκητα, σε κάποιες από αυτές παρατηρήθηκαν και οι δύο μορφές ταυτόχρονα (τέλεια και ατελής). Αναλυτικά, σε όλες τις απομονώσεις παρατηρήθηκαν ακέρβουλα στο στερεοσκόπιο τα οποία παρήγαγαν κονίδια (Εικ. 6). Σε ορισμένες απομονώσεις όμως παρατηρήθηκε στερεοσκοπικά και η παρουσία περιθηκίων και οστιόλης. Οι απομονώσεις στις οποίες παρατηρήθηκε στερεοσκοπικά οστιόλη είναι οι εξής 7 απομονώσεις: 2, 12, 20, 28, 29, 30 και 31 (Εικ. 7). Από βιβλιογραφικές πηγές δεν διευκρινίζεται αν τελικά ο μύκητας *Gnomonia leptostyla* είναι ετερόθαλλος ή ομόθαλλος. Στη συγκεκριμένη μελέτη όμως η παρουσία οστιόλης και περιθηκίων μαρτυρά πως πιθανότατα ο μύκητας να ανήκει στη κατηγορία των ετερόθαλλων μυκήτων.



Εικόνα 6: Σχηματισμοί ακέρβουλων πάνω σε μυκηλιακές υφές. Στερεοσκοπική παρατήρηση (Nikon SMZ-4)



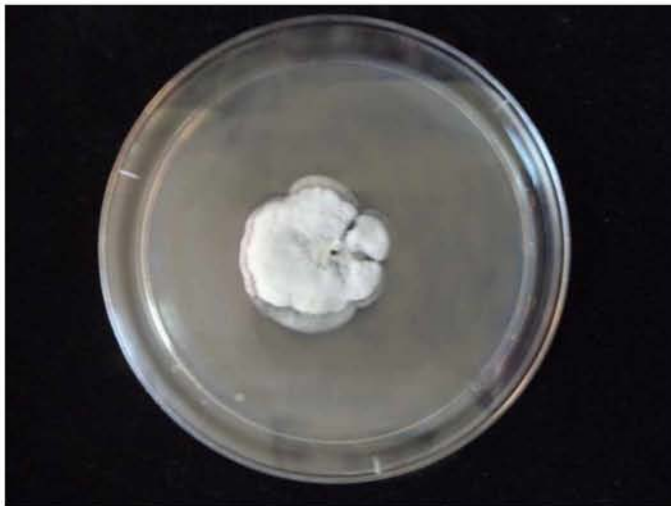
Εικόνα 7: Σχηματισμός οσιόλης πάνω σε περιθήκιο της απομόνωσης 12. Στερεοσκοπική παρατήρηση (Nikon SMZ-4)

Στις επόμενες εικόνες δίνεται η ανάπτυξη του μυκηλίου όπως αποτυπώθηκε σε τρία στάδια για επιλεγμένες αποικίες όπως παρουσιάζονται παρακάτω. Το αρχικό στάδιο, όπου παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μύκητα τις πρώτες ημέρες μετά τον εμβολιασμό, το ενδιάμεσο στάδιο μετά από περίπου 20 ημέρες και το τελικό στάδιο όπου έχει πραγματοποιηθεί η σποριοποίηση του μύκητα.

Απομόνωση 1: (Εικ. 8-10)



Εικόνα 8: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό

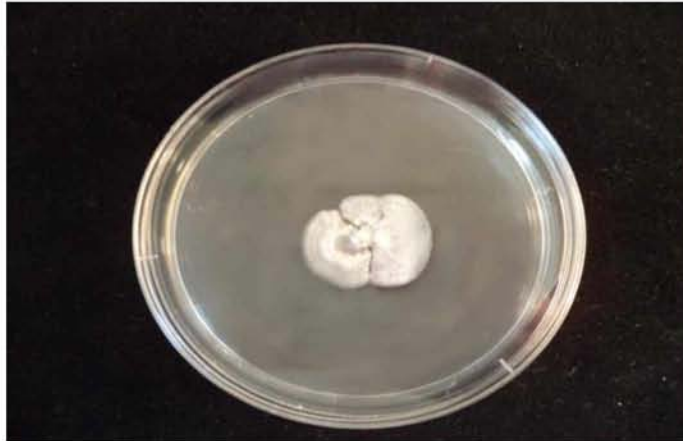


Εικόνα 9: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 10: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 2: (Εικ. 11-13)



Εικόνα 11: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 12: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 13: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 3: (εικ. 14-16)



Εικόνα 14: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 15: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 16: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 4: (Εικ. 17-19)



Εικόνα 17: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 18: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 19: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

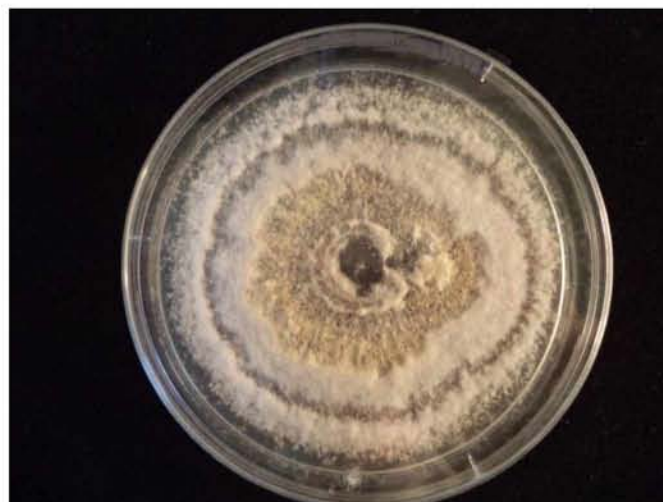
Απομόνωση 10: (Εικ. 20-22)



Εικόνα 20: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 21: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 22: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

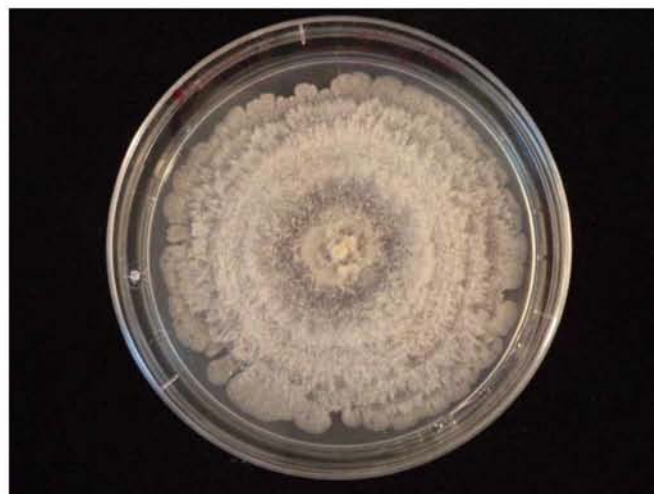
Απομόνωση 11: (Εικ. 23-25)



Εικόνα 23: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό

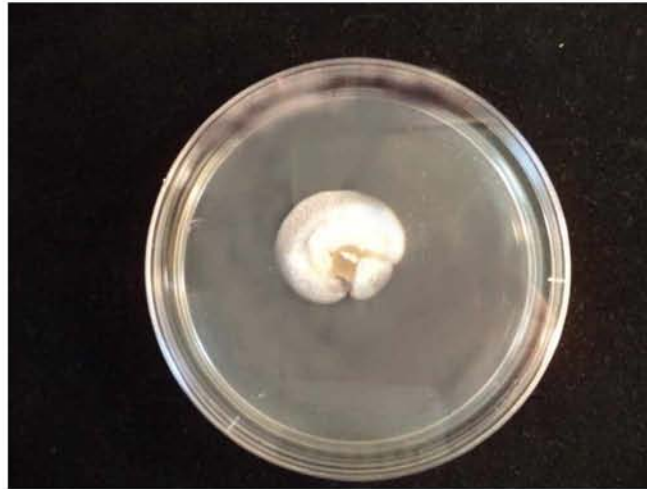


Εικόνα 24: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 25: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 14: (Εικ. 26-28)



Εικόνα 26: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 27: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 28: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 20: (Εικ. 29-31)



Εικόνα 29: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό

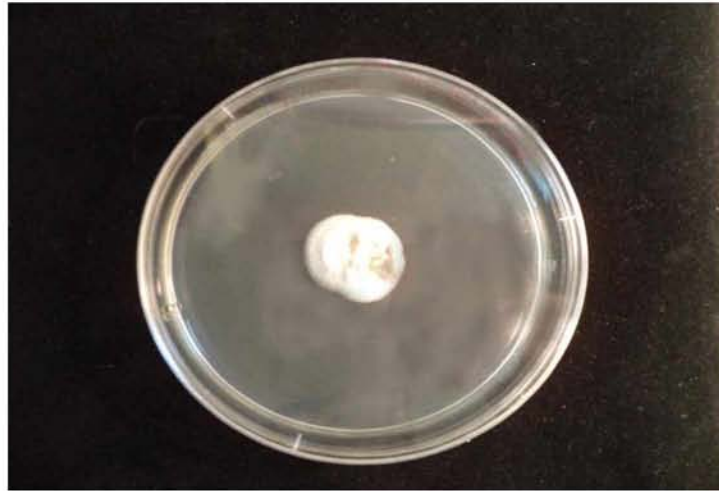


Εικόνα 30: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 31: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 22: (Εικ. 32-34)



Εικόνα 32: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 33: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 34: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 23: (Εικ. 35-37)



Εικόνα 35: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 36: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 37: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 25: (Εικ. 38-40)



Εικόνα 38: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό

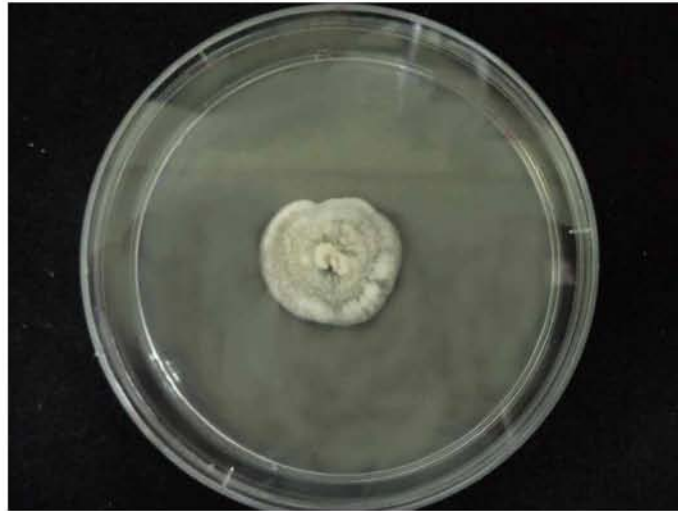


Εικόνα 39: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό

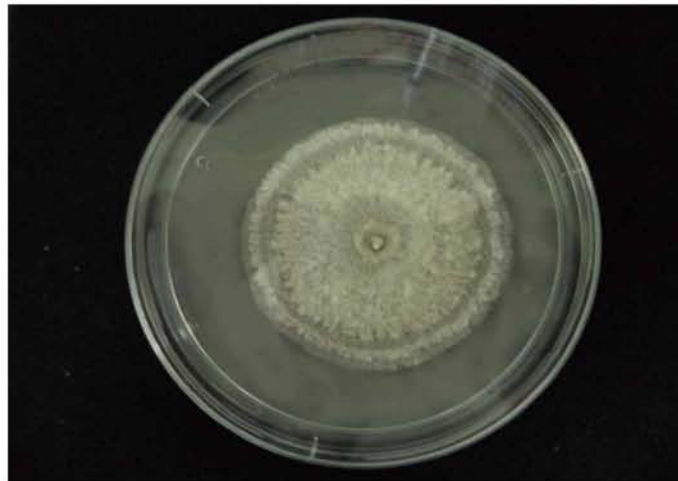


Εικόνα 40: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 26: (Εικ. 41-43)



Εικόνα 41: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό

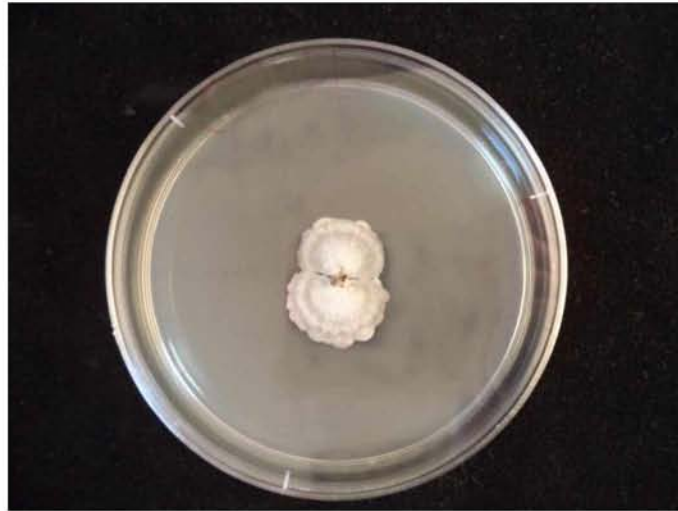


Εικόνα 42: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 43: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 29: (Εικ.44-46)



Εικόνα 44: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό

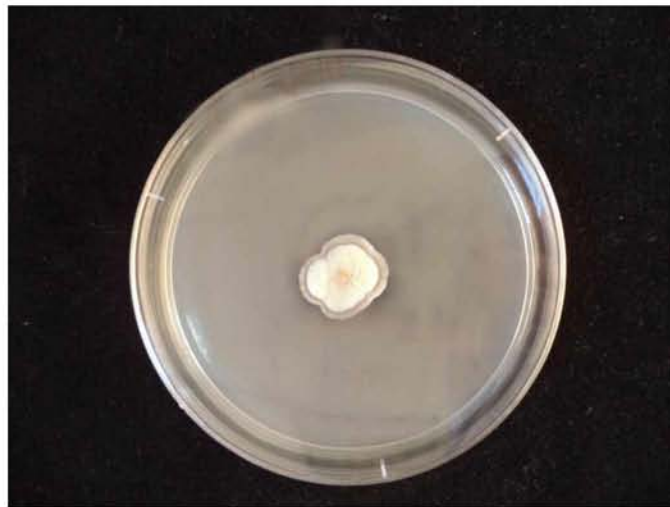


Εικόνα 45: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 46: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 31: (Εικ. 47-49)



Εικόνα 47: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό

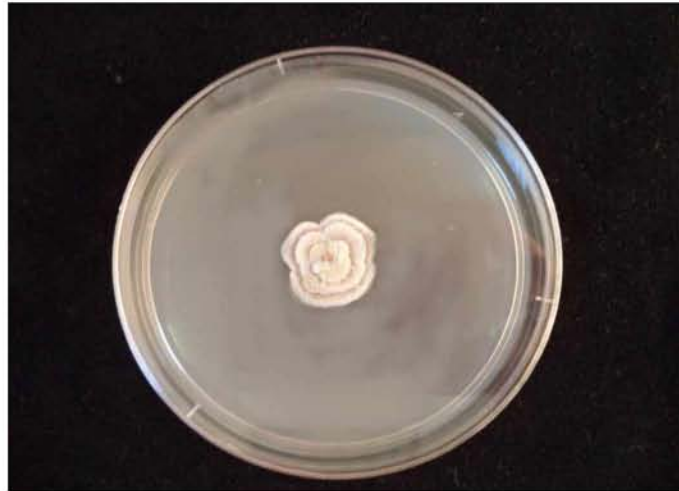


Εικόνα 48: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 49: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 33: (Εικ.50-52)



Εικόνα 50: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 51: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 52: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

Απομόνωση 35: (Εικ. 53-55)



Εικόνα 53: ανάπτυξη αποικίας 10 μέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 54: ανάπτυξη αποικίας 20 ημέρες μετά τον εμβολιασμό



Εικόνα 55: ανάπτυξη αποικίας μετά τη σποριοποίηση του μύκητα

3.5. Έλεγχος της ανθεκτικότητας των μυκητοκτόνων

Το πείραμα ελέγχου της ανθεκτικότητας *in vitro* του μύκητα *Ophiognomonina leptostyla* στις 5 δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και στις 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις τους, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των πλακών μικροπιλοδότησης όπως αυτή περιγράφεται από τη FRAC για άλλους μύκητες, με το πέρας των 10 ημερών όπου το μυκήλιο είχε αναπτυχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Στα βοθρία που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, για την απόκλιση επιμόλυνσης, βρέθηκε ότι η απορρόφηση στα 405nm δεν επηρέασε καθόλου τα τελικά αποτελέσματα των μετρήσεων μιας και δεν υπήρξαν επιμολύνσεις. Στις πλάκες μικροπιλοδότησης εξετάστηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα τη 10^η ημέρα ανάπτυξης. Μετά από στατιστική ανάλυση Probit με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS, στις μετρήσεις που ελήφθησαν και το EC50, όλες οι απομονώσεις που εξετάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως μη ανθεκτικές και στις 5 δραστικές ουσίες των μυκητοκτόνων που χρησιμοποιήθηκαν (Πίν. 4).

Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές του EC50 για τη δραστική ουσία cyproconazole κυμάνθηκαν σε συγκεντρώσεις από <0,001 έως 0,093, αντίστοιχα για τη δραστική ουσία boscalid κυμάνθηκαν από <0,001 έως 0,087, για τη δραστική ουσία fenhexamid από <0,001 έως 0,035, για τη δραστική ουσία pyrimethanil από <0,001 έως 0,071 και για τη δραστική ουσία azoxystrobin από <0,001 έως 0,089. Οι μέσοι όροι των τιμών EC50 ανά δραστική ουσία είναι οι εξής: cyproconazole: 0,021, boscalid: 0,013, fenhexamid: 0,072, pyrimethanil: 0,017, azoxystrobin: 0,016.

Παρατηρείται ότι, σε όλες τις απομονώσεις και σε όλες τις δραστικές ουσίες, οι τιμές του EC50 ήταν ιδιαίτερα χαμηλές γεγονός που καθιστά όλες τις απομονώσεις ευαίσθητες στις δραστικές ουσίες που εξετάστηκαν. Οι δραστικές ουσίες που φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ήταν το boscalid και το azoxystrobin. Το boscalid ήταν αποτελεσματικό σε μεγαλύτερες δόσεις (0,1mg/L, 1mg/L και 10mg/L) μιας και η χαμηλότερη συγκέντρωση που προκάλεσε επιβράδυνση ή διακοπή της ανάπτυξης του μυκηλίου είναι τα 0,1mg/L ενώ το azoxystrobin φάνηκε να είναι πολύ πιο αποτελεσματικό ακόμα και από τη συγκέντρωση των 0,01mg/L. Γι αυτό και το azoxystrobin θεωρείται η αποτελεσματικότερη δραστική ουσία από τις 5 που

εξετάστηκαν για το μύκητα. Οι υπόλοιπες τρεις δραστικές δεν ήταν τόσο αποτελεσματικές αφού το μυκήλιο του μύκητα συνέχισε να αναπτύσσεται κανονικά.

Πίνακας 4: Τιμές EC50 για κάθε απομόνωση συγκριτικά με την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα *Gnomonia leptostyla* σε απορρόφηση 405 nm.

Αριθμός απομόνωσης	Cyproconazole	Boscalid	Fenhexamid	Pyrimethanil	Azoxystrobin
1	0,002	0,061	0,009	0,018	0,031
2	0,018	0,009	0,007	0,071	0,063
3	0,007	0,003	0,019	0,067	0,058
4	<0,001	0,027	<0,001	<0,001	<0,001
5	0,001	<0,001	0,003	0,033	0,089
7	<0,001	<0,001	0,022	0,028	0,019
8	0,017	0,001	0,003	0,016	0,009
9	0,028	<0,001	0,001	0,007	0,012
10	<0,001	0,017	0,035	<0,001	<0,001
11	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
12	0,006	0,023	<0,001	0,011	0,001
13	0,059	<0,001	0,006	<0,001	0,011
14	0,001	<0,001	<0,001	0,008	0,007
15	0,005	<0,001	0,001	0,027	0,021
16	0,077	0,001	<0,001	0,001	0,008
17	0,039	0,034	0,004	0,002	0,003
18	0,001	0,002	0,002	<0,001	0,008
19	0,056	0,008	0,008	0,037	0,002
20	0,093	0,002	0,007	0,004	0,003
21	0,028	0,021	0,017	0,011	0,005
22	0,069	0,016	<0,001	0,011	0,018
23	<0,001	0,087	0,002	0,006	0,006
24	0,002	0,001	0,001	0,003	0,004
25	0,021	0,016	0,003	0,007	0,023
26	0,033	0,018	0,007	0,048	0,006
27	<0,001	<0,001	<0,001	0,058	0,034
28	0,083	0,033	0,001	0,009	0,012
29	<0,001	<0,001	<0,001	0,006	0,013
30	0,024	0,009	<0,001	0,009	0,002
31	0,009	0,003	0,002	0,003	0,002
32	0,027	0,029	0,031	0,011	0,019
33	0,008	0,012	0,009	0,010	0,017
35	0,003	0,001	<0,001	0,007	<0,001
36	0,021	0,009	0,019	0,031	0,041
37	<0,001	0,016	0,026	0,026	0,007

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανθράκωση αποτελεί την πιο καταστροφική μυκητολογική ασθένεια για τη καρυδιά σε παγκόσμια κλίμακα. Λόγω της αύξησης της παραγωγής καρυδιών τα τελευταία χρόνια στη χώρα μας κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή νέων αποτελεσματικότερων δραστικών ουσιών για την αντιμετώπισή της. Η βιβλιογραφικές πηγές σε παγκόσμιο επίπεδο για τη συγκεκριμένη ασθένεια και το παθογόνο αίτιο που την προκαλεί είναι πολύ περιορισμένες. Η ασθένεια οφείλεται στο μύκητα *Gnomonia leptostyla* και αποτελεί το βασικό πεδίο μελέτης της παρούσας διατριβής.

Πραγματοποιήθηκε αρχικά συλλογή προσβεβλημένων φύλλων από 2 περιοχές της Κεντρικής Ελλάδας: το Παλαμά Δομοκού και τη Μπούφα Μαγνησίας. Στη συνέχεια, από τα δείγματα που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε απομόνωση του μύκητα *Gnomonia leptostyla* και καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα PGA. Η απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν με τρεις διαφορετικές μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος με τη χρήση του υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) (Amiri, Saremi 2010), αποτέλεσε την πιο αποτελεσματική όλων των μεθόδων και αποτελεί μία από τις μεθόδους απομόνωσης που χρησιμοποιούνται κατά κόρον παγκοσμίως.

Οι άλλες δύο μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά σε πείραμα απομόνωσης του παθογόνου *Gnomonia leptostyla* και δεν περιγράφονται στη παγκόσμια βιβλιογραφία. Η μέθοδος με τη χρήση γέλης αγαρόζης (gel agarose) και η μέθοδος της σταγόνας (ΣΤΑΓ) αποτελούν δυο αποτελεσματικές, αξιόπιστες και καινοτόμες μεθόδους απομόνωσης που θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω και να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά ως εναλλακτικές μέθοδοι απομόνωσης για το συγκεκριμένο φυτοπαθογόνο ή ακόμα και για άλλους μύκητες της ίδιας οικογένειας ή διαφορετικών οικογενειών. Επίσης, η μέθοδος απομόνωσης δεν αποτέλεσε παράγοντα που επηρεάζει το φαινότυπο.

Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν έγινε αναφορά στο γενετικό υπόβαθρο του μύκητα παρά μόνο στη φαινοτυπική του ανάπτυξη και ποικιλομορφία. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δεν έχει μελετηθεί η φαινοτυπική ανάπτυξη του παθογόνου *in vitro* στη παγκόσμια βιβλιογραφία προηγουμένως. Για πρώτη φορά, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση του φαινοτύπου *in vitro* κατά

την ανάπτυξη της αποικίας σε τρυβλία Petri και διάκριση 4 ομάδων φαινοτύπου στις 35 υπό μελέτη απομονώσεις του μύκητα. Αυτή η διάκριση δεν αποτελεί τη βάση καθορισμού των φαινοτύπων αλλά μία υποκειμενική κατηγοριοποίησή τους με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά όπως είναι η υφή, το χρώμα και η ανάπτυξη του μυκηλίου, κατηγοριοποίηση που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε επόμενες μελέτες.

Ο χρωματισμός σε όλες τις απομονώσεις δεν διέφερε ιδιαίτερα. Επικρατούσε το λευκό, υπόλευκο χρώμα που σε κάποια σημεία, κυρίως σε ανεπτυγμένο στάδιο ανάπτυξης αποκτούσε ένα πιο σκούρο κιτρινωπό χρώμα. Διαφορά διακρίνεται στην υφή που είχε η εκάστοτε αποικία καθώς και η διαφορά στο σχηματισμό των μυκηλιακών υφών κατά την ανάπτυξη στους 20°C. Η αποικία σε κάποιες από τις απομονώσεις αποκτούσε πιο κυκλική μορφή και σε άλλες πιο ακανόνιστη μορφή. Δεν μπορούμε να πούμε με σαφήνεια αν κάποιος από τους φαινοτύπους επικράτησε των άλλων διότι το δείγμα των απομονώσεων ήταν μικρό ώστε να καταλήξουμε σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.

Σε μερικές από τις απομονώσεις η ανάπτυξη της αποικίας ήταν πολύ μεγάλη καθώς έφτανε έως και τα 9cm διάμετρο στο τελικό στάδιο ανάπτυξής τους. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως θερμοκρασία, σχετική υγρασία και φως καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος παρέμειναν αμετάβλητες. Μεταβολές στους παραπάνω εξωτερικούς παράγοντες πραγματοποιήθηκαν στιγμιαία μόνο κατά τη μεταφορά των απομονώσεων σε συνθήκες δωματίου για ελάχιστο χρονικό διάστημα κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Συνεπώς, οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν φαίνεται να επηρέασαν το φαινότυπο και δεν καθόρισαν τη φαινοτυπική διαφοροποίησή τους. Αντιθέτως, η φαινοτυπική παραλλαγή και ποικιλομορφία πιθανόν να οφείλεται κυρίως σε γενετικούς παράγοντες οι οποίοι δεν μελετήθηκαν στη παρούσα διατριβή και αποτελεί ένα ενδιαφέρον κεφάλαιο για περαιτέρω ενδελεχή έρευνα στο μέλλον.

Ο μύκητας εξετάστηκε σχετικά με την ανθεκτικότητα και την ευαισθησία σε 5 δραστικές ουσίες από διαφορετικές ομάδες μυκητοκτόνων η καθεμία. Οι δραστικές ουσίες είναι οι εξής: cyproconazole, boscalid, fenhexamid, pyrimethanil και azoxystrobin. Για καθεμία από τις δραστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν 5 συγκεντρώσεις 0,001, 0,01, 0,1, 1 και 10mg/L. Οι παραπάνω δραστικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρέως για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών σε πολλά φυτικά είδη αλλά δεν είναι εγκεκριμένες από το αρμόδιο υπουργείο της χώρας για την καταπολέμηση της ανθράκωσης στην καρυδιά πλην του boscalid που έχει έγκριση για τη συγκεκριμένη καλλιέργεια.

Ο λόγος που επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες είναι διότι αποτελούν κύριες δραστικές βασικών ομάδων μυκητοκτόνων που χρησιμοποιούνται στη φυτοπροστασία γενικότερα και είναι πολύ αποτελεσματικές. Σε πολλές περιπτώσεις άλλων μυκήτων έχει αναπτυχθεί ανθεκτικότητα στις συγκεκριμένες δραστικές ουσίες όμως στη περίπτωση του μύκητα *Gnomonia leptostyla*, λόγω της μη χρήσης τους, η παρούσα διατριβή αποτέλεσε ένα βήμα βιοδοκιμής της αποτελεσματικότητάς τους κατά του μύκητα.

Μέχρι τώρα, στην παγκόσμια βιβλιογραφία δεν έχει εφαρμοστεί κάποιο πείραμα ελέγχου της ευαισθησίας απομονώσεων του μύκητα στις συγκεκριμένες ομάδες μυκητοκτόνων. Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα μυκητοκτόνα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο πλακών μικροτιτλοδότησης (microtiter test) όπου εξετάστηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου και μετρήθηκε η απορρόφηση του στα 405nm όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο ελέγχου ανθεκτικότητας της FRAC για άλλους μικροοργανισμούς. Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων, φαίνεται πως καμία από τις απομονώσεις δεν έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε καμία από τις χρησιμοποιούμενες δραστικές. Αυτό είναι απολύτως λογικό διότι οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες δεν έχουν έγκριση για τη συγκεκριμένη ασθένεια και για το λόγο αυτό δεν χρησιμοποιούνται στη χώρα μας.

Ακόμη, όλες οι απομονώσεις θεωρήθηκαν ευαίσθητες και στις 5 δραστικές μιας και οι τιμές EC50 ήταν πολύ χαμηλές. Όσον αφορά την

αποτελεσματικότητα, το boscalid που είναι εγκεκριμένο από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της ανθράκωσης στη καρυδιά, φάνηκε να δρα αποτελεσματικά κατά του μύκητα. Όσον αφορά το azoxystrobin, που ανήκει στην ομάδα των στρουμπιλορινών, φαίνεται πως ήταν η πιο αποτελεσματική από τις δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ακόμα και στη μικρότερη συγκέντρωση (0,001mg/L). Το azoxystrobin χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διατριβή αποκλειστικά και μόνο για πειραματικούς σκοπούς αφού η χρήση του για τη καταπολέμηση της ασθένειας δεν είναι εγκεκριμένη στη χώρα μας. Τέλος, με περαιτέρω μελέτη στο μέλλον και επιπλέον βιοδοκιμές *in vitro* αλλά και *in vivo* το azoxystrobin ίσως θα μπορούσε να εγκριθεί από το αρμόδιο υπουργείο και να αποτελέσει την επόμενη δραστική ουσία που θα χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά κατά της ανθράκωσης στην καρυδιά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βασιλακάκης, Μ., (2004). Γενική και Ειδική Δενδροκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη
- Γεωργόπουλος, Σ., (1984). Βασικές γνώσεις Φυτοπαθολογίας. Αθήνα
- Γεωργόπουλος, Σ., Ζιώγας, Β., (1992). Αρχές και μέθοδοι καταπολέμησης των ασθενειών των φυτών. Αθήνα
- Γιαννοπολίτης, Κ., (2005). Οδηγός γεωργικών Φαρμάκων. Αγρότυπος. Αθήνα
- Ζιώγας, Β., Μάρκογλου, Α., (2010). Γεωργική Φαρμακολογία. Αθήνα
- Ρούσκας, Δ., Καρυδιά (Juglans Regia L.) undated
- Ρούσκας, Δ., Ρούμπος, Ι., (1997). Η ανθράκωση της καρυδιάς στην Ελλάδα, Περιοδικό «Γεωργία Κτηνοτροφία» Τεύχος 6 Ιούλιος-Αύγουστος 1997. σελ 37-40
- Τζάμος, Ε., (2007). Φυτοπαθολογία Β' Έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agrios, G., (2007). Plant Pathology. Academic press
- Apostolides, C.A., (1952). Contribution to the mycological flora of Greece. Annals Benaki Phytopath. Inst., 62-78.
- Barlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, JR., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., (2002). The strobilurin fungicides. Pest Management Science (pp. 58)
- Belisario, A., Teviotdale, B. L., Michailides, T. J. and Pscheidt, J. W. (2002). "Anthracnose", in Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones, Eds. USA: APS Press. 77-78
- Belisario, A., Scotton, M., Santori, A., Onfri, S., (2008). Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, homothallism and resistance of *Juglans* species to anthracnose. Forest Pathology, vol. 38, 129-145.
- Belisario, A., Zoina, A. and Barbieri, G., (1999). Epidemiological survey of *Gnomonia leptostyla* in *Juglans* orchard. 4th International Walnut Symposium. Bordeaux, France (pp. 67)
- Berry, L. and Frederick, H., (1997). Control of walnut anthracnose with fungicides in a black walnut plantation. Plant Dis. Rep. 61, 378-379
- Berry, L.I., Frederick, H., (1981). Walnut Anthracnose Forest Insect & Disease Leaflet 85. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Area State & Private Forestry Broomall, PA

- Black, W. and Neely, D., (1974). Effects of selected environmental factors on the severity of walnut anthracnose. Proceedings of the American Phytopathological Society. USA. (pp 284)
- Black W. and Neely D., (1978). Relative resistance of *Juglans* species and hybrids to walnut anthracnose. Plant Disease Reporter 62, 497-499
- Black, W., (1977). Ecology and epidemiology of walnut anthracnose. Univ., Urbanu, USA. Dissertation Abstracts International B 38: 24-56
- Black, W., Neely, D., (1978). Effects of temperature, free moisture and relative humidity on the occurrence of walnut anthracnose. Phytopathology 68, 1054-1056
- Brent, K.J., Hollomon, D.W., (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph II. Global Crop Protection Federation, Brussels, (pp 48)
- Brent, K.J. and Hollomon, D.W., (2007). Fungicide resistance: The assessment of risk FRAC Monograph No 2, second revised edition, FRAC, (pp52)
- Brent, K.J., (1991). Monitoring fungicide resistance: Purposes, Procedure and progress. Resistance 91-Achievement and developments in combating Pesticide Resistance, eds. Ian Denholm, Alan Devonshire and Derek Hollomon , SCI
- Brent, K.J., Hollomon, D.W. and Shaw, M.W., (1990). Predicting the evolution of fungicide resistance. In: Managing Resistance to

Agrochemicals, Green M.B., Le Baron, H.M., and Moberg, W.K. eds. American Chemical Society, Washington DC, 303-319.

- Chen, C., Wang, J., Luo, Q., Yuan, S. Zhou, M., (2007). Characterization and fitness of carbendazim-resistant strains of *Fusarium graminearum*. *Pest Management Science* 63(12), 1201-7

- Cline, S., and Neely, D., (1983). Penetration and infection of leaves of black walnut by *Marssonina juglandis* and resulting lesion development. *Phytopathology* 73, 458-462

- Cline, S., and Neely, D., (1984). Relationship between juvenile- leaf resistance to anthracnose and the presence of Juglone and Hydrojuglone Glucoside in black walnut. *Phytopathology* 74, 185-188

- Fayret, J., (1974). Photoinhibition of perithecial formation during sexual morphogenesis in *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not.. *Compte Rendu Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Science. Series D. Science Naturelles.* 278, 2909-2912

- Fayret, J. and Vito, J., (1981). Relations between mycosporin production and localization and reproductive morphogenesis in the pyrenomycete *Gnomonia leptostyla*. *Physiologia Plantarum*, 51, 299-303

- Fayret, J. (1977) Effect of nutritional factors on the growth and induction of reproductive morphogenesis in vitro of *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not. *Revue de Mycologie*, 41, 49-72

- Gard, M., (1928). On the causes of the unproductiveness of walnut trees and the vine in 1926. In *Rev. Appl. Mycol.* 8, 322.

- Hammond, J.B., (1931). Some diseases in walnuts. Ann Rept. East Malling. Res. Stn., 143-149

- Hanlin, R., (1990). Illustrated Genera Of Ascomycetes. APS Press

- Hollomon, D.W., Schmidt, H.H., (1995). 2-Aminopyrimidine Fungicides. In: Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanisms of Action. Second Edition. Gustav Fischer NY (pp 355)

- Hyun-Tae, Lee, Hyeon, Dong Shin, (2000). Taxonomic studies on the genus *Marssonina* in Korea. Mycobiology 281, 39-46

- Jafarpour, B., (1990). Study on anthracnose disease in Mashed, Iran

- Juhasova, G., Ivanova, H., (2016). Occurrence and spread of the parasitic microscopic fungi on walnut (*Juglans regia*) on various localities of Slovakia

- Juhasova, G., Ivanova, H., Spisak, J., (2006). Biology of fungus *Gnomonia leptostyla* in agro-ecological environments of Slovakia. Mikologica Fitopatologie 40, 538–547

- Klebahn, H., (1907). Untersuchungen über einige fungi imperfecti und die zugehörigen ascomycetenformen. IV
Marssonina juglandis (Lib.) Sacc. Z. Pflanzenkrankh 17, 223-237

- Larkin, R.P., Roberts, D.P., Gracia-Garza, J.A., (1998). Biological control of fungal diseases. In: Fungicidal Activity (DH Hutson, J Miyamoto). Wiley Series in Agrochemicals and Plant Protection. John Wiley and Sons, (pp 149)
- Li-hua, Jin, Yu Chen, Chang-jun, Chen, Jian-xin, Wang, Ming-guo ZHOU, (2009). Activity of azoxystrobin and SHAM to four phytopathogens
- Lucas, JA, (1998). Plant Pathology and Plant Pathogens, 3rd edition, Blackwell Science, Oxford, USA
- Manfred, E. Mielke and Michael, E. Ostry. Diseases of intensively managed eastern black walnut. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium, (pp 113)
- Matteoni, J., and Neely, D., (1977). Infection frequency and severity of walnut anthracnose with artificial inoculation. Proceedings of the American Phytopathological Society 4, 166-172
- Matteoni, J.A. and Neely, D., (1979). *Gnomonia leptostyla*: growth, sporulation, and heterothallism. Mycologia, 71, 1034-1042
- Miller, P.W., Schuster, C.E., Stephenson, R.E., (1945). Diseases of walnuts in the Pacific Northwest and their control. Ore. Agric. Exp. Stn. Bull. 435, (pp 42)
- Milling, R.J., Daniels, A., Pillmoor, J.B., (1995). The mode of action of the anilinopyrimidines: a new fungicide target. In: Antifungal Agents- Discovery and Mode of Action (GK Dixon, LG Copping and DW Hollomon, eds). Oxford/BIOS Scientific Publishers, Oxford, (pp 201)

- Neely, D., (1978). Nitrogen fertilization reduces the severity of walnut anthracnose. *Phytopathological News* 12, 90-92

- Neely, D., Black, WM., (1976). Anthracnose of black walnuts in the Midwest. *Plant Disease Reporter* 60 ,519–521

- Nelly, D., (1981). Application of nitrogen fertilizer to control anthracnose of black walnut. *Plant disease* 65: 580-581

- Pastore, M., Consoli, D., Cristinzio, G., (1997). Susceptibility of 32 walnut varieties to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas campestris* pv. *Juglandis*. *Acta Horticulturae* 442, (pp 379-383)

- Pijls, C. F. N., Shaw, M. W., Parker, A., (1994). A rapid test to evaluate *in vitro* sensitivity of *Septoria tritici* to flutriafol, using a microtiter plate reader. *Plant Pathology* 43, 726-732

- Pollegioni, P., Van der Linden, G., Belisario, A., (2011). Mechanisms governing the responses to anthracnose pathogen in *Juglans* spp. *Journal of biotechnology*

- Rabeifar, A., (1998). Survey on anthracnose disease in Iran. 13th Iranian Plant Protection Congress. (pp 223)

- Rekanović, E., Mihajlović, M., (2010). *In vitro* Sensitivity of *Fusarium graminearum* to Difenoconazole. *Prothioconazole and Thiophanate-Methyl. Phytomedical* 25, 325-333

- Rosnev, B., and Tsanov, P., (1980). The distribution of anthracnose in Bulgaria and measures to reduce its damage in walnut. *Gorkostopanska Nauka* 17, 44-56
- Rouskas, D., Rumbos, J., (1994). Etude d' anthracnose de noyer en Grece. Projet Noix U.E etude de premiere annee, ed. ARS de Lamia, (pp 3)
- Salahi, S., Javan, M., Nikkhah, Jamshidi, S., (2009). Study on population structure of *Gnomonia leptostyla*, causal agent of walnut anthracnose in East Azerbaijan province, Iran. *New Agricultural Science Journal*, vol. 3, no. 6, (pp 53-68)
- Saremi, H and Hashemi, R., (2000). Distribution and epidemiology of walnut black spot (anthracnose) in Iran. 14th Iranian Plant Protection Congress. (pp 332)
- Saremi H, Amiri M.E., (2010). Evaluation of resistance to anthracnose (*Marssonina juglandis*) among diverse Iranian clones of walnut (*Juglans regia* L.)
- Shurtleff, M.C. and Averre, C.W., (2002). *The Plant Disease Clinic and Field Diagnosis of Abiotic Diseases*
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., Gisi, U., (2000). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 complex of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science* 56, 833-841

- Sierotzki, H., Wullschleze, J., Gisi U., (2000). Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 107-112

- Sinclair W.A. and Lyon H.H., (2005). *Diseases of trees and shrubs*. Second edition. (pp 104)

- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Lelliott, R.A., Archer, S.A., (1988). *European Handbook of Plant Diseases*

- Sogonov, M. V., Castlebury, L. A. , Rossman, A. Y., Mejia, L. C., and White ,J. F., (2008). Leaf-inhabiting genera of the *Gnomoniaceae*, *Diaporthales*. *Studies in Mycology*. 62, 1-79

- Soleiman, Jamshidi, (2010). Photoperiod and pH Effects on *Ophiognomonia leptostyla* Growth and Sporulation. 2011 International Conference on Biology, Environment and Chemistry IPCBEE vol.24 (2011) IACSIT Press, Singapore

- Soleiman, Jamshidi, and Salahi, S., (2009). Growth and sporulation of some *Gnomonia leptostyla* isolates in various culture media. *Journal of New Agricultural Science*, 2009. 4, 1-10

- Soleiman, Jamshidi, Rasoul Zare, Hamid-Reza Zamanizadeh and Saeed, Rezaee, (2010). Homothallism in *Ophiognomonia leptostyla* isolates collected from Iran. The 2010 International Conference on Agricultural and Animal Science

- Soleiman, Jamshidi, Rasoul, Zare, (2011). Molecular phylogeny of *Ophiognomonina leptostyla* isolates collected from Iran based on ITS nrDNA sequencing. Proceeding of International Conference of Biotechnology and Food Science. Indonesia, April 1-3, 2011, 130-132
- Stammler, G., Kern, L., Semar, M., Gattli, A., Schofl, U., (2008). Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to DMI fungicides related to mutations in the target gene *cyp51* (14^α-demethylase). Modern Fungicides and Antifungal Compounds, (pp 137-142)
- Stammler, G., Speakman, J., (2006). Microtiter Method to Test the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Boscalid. *Journal Phytopathology* 154, (pp 508–510)
- Vechelyi, K., Penzes-Toth, T., (1990). Life cycle, forecast and control of *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces et de Not. *Acta Horticulturae* 284, 303
- Weber, B., (1984). What's new in black walnut research? Proceedings 15th Annual meeting of the Walnut Council. Lexington. KY. (pp 24-28)
- Woeste, K. and Beineke, W., (2001). An efficient method for evaluating black walnut for resistance to walnut anthracnose in field plots and the identification of resistant genotypes. *Plant Breeding*, 120
- Wood, P.M., Hollomon, D.W., (2003). A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides at the Qo site of complex III. *Pest Management Science*, 59, 499

- Ziogas, B.N., Baldwin, B.C., Young, J.E, (1997). Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science*, (pp 28-34)

- Ziogas, B.N., Markoglou, A.N., Malandrakis, A.A., (2003). Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 311

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Κατάλογος δραστικών ουσιών ανά καλλιέργεια και παθογόνο. <http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bfuncs.aspx > [Last Access: 5/5/2019]
- <<https://www.syngenta.gr/proionta/fytoprostantasia/mykitoktono/atemi-10-wg>> [Last Access: 5/5/2019]
- <<https://www.cropscience.bayer.gr/el-GR/Products/Crop-Protection/Fungicides/Teldor-50-WG.aspx> > [Last Access: 5/5/2019]
- <<https://www.agro.basf.gr/el/Products/Overview/Scala%C2%AE-40-SC.html>> > [Last Access: 5/5/2019]
- <<https://www.alfagro.gr/mykitioktona/689/MIRADOR-25-SC/>> [Last Access: 5/5/2019]
- FAO (2010). < <http://www.fao.org/3/CA2760EN/ca2760en.pdf>> [Last Access: 5/5/2019]
- FRAC (2009):<http://www.frac.info/docs/default-source/monitoring-methods/approved-methods/septr-microtiter-monitoring-method-basf-2009-v1.pdf?sfvrsn=ad99419a_4> [Last Access: 7/5/2019]
- FRAC(2007):<<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf>> [Last Access: 7/5/2019]
- Michigan State University: <https://www.canr.msu.edu/news/walnut_anthracoise_is_putting_an_early_end_to_many_leaves> [Last Access: 2/5/2019]
- The Pennsylvania university: <<https://extension.psu.edu/walnut-anthracoise>> [Last Access: 2/5/2019]
- Themis Michailides and Richard Buchner <<http://cete.hama.ucanr.edu/files/146848.pdf>> [Last Access: 18/4/2019]

- Themis Michailides, Richard Buchner and Bill Coates
<<http://cetehama.ucanr.edu/files/183215.pdf>> [Last Access: 18/4/2019]
- U.S National library of medicine. Nation Center for Biotechnology Information: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boscalid>> [Last Access: 7/5/2019]
- University of Illinois Extensions Factsheets 1987:
<<https://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet/25546>> [Last Access: 2/5/2019]